This is a digital copy of a book that was preserved for generations on library shelves before it was carefully scanned by Google as part of a project to make the world's books discoverable online.

It has survived long enough for the copyright to expire and the book to enter the public domain. A public domain book is one that was never subject to copyright or whose legal copyright term has expired. Whether a book is in the public domain may vary country to country. Public domain books are our gateways to the past, representing a wealth of history, culture and knowledge that's often difficult to discover.

Marks, notations and other marginalia present in the original volume will appear in this file - a reminder of this book's long journey from the publisher to a library and finally to you.

Usage guidelines

Google is proud to partner with libraries to digitize public domain materials and make them widely accessible. Public domain books belong to the public and we are merely their custodians. Nevertheless, this work is expensive, so in order to keep providing this resource, we have taken steps to prevent abuse by commercial parties, including placing technical restrictions on automated querying.

We also ask that you:

+ *Make non-commercial use of the files* We designed Google Book Search for use by individuals, and we request that you use these files for personal, non-commercial purposes.
+ *Refrain from automated querying* Do not send automated queries of any sort to Google's system: If you are conducting research on machine translation, optical character recognition or other areas where access to a large amount of text is helpful, please contact us. We encourage the use of public domain materials for these purposes and may be able to help.
+ *Maintain attribution* The Google "watermark" you see on each file is essential for informing people about this project and helping them find additional materials through Google Book Search. Please do not remove it.
+ *Keep it legal* Whatever your use, remember that you are responsible for ensuring that what you are doing is legal. Do not assume that just because we believe a book is in the public domain for users in the United States, that the work is also in the public domain for users in other countries. Whether a book is still in copyright varies from country to country, and we can't offer guidance on whether any specific use of any specific book is allowed. Please do not assume that a book's appearance in Google Book Search means it can be used in any manner anywhere in the world. Copyright infringement liability can be quite severe.

About Google Book Search

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Book Search helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at `http://books.google.com/`

A propos de ce livre

Ceci est une copie numérique d'un ouvrage conservé depuis des générations dans les rayonnages d'une bibliothèque avant d'être numérisé avec précaution par Google dans le cadre d'un projet visant à permettre aux internautes de découvrir l'ensemble du patrimoine littéraire mondial en ligne.

Ce livre étant relativement ancien, il n'est plus protégé par la loi sur les droits d'auteur et appartient à présent au domaine public. L'expression "appartenir au domaine public" signifie que le livre en question n'a jamais été soumis aux droits d'auteur ou que ses droits légaux sont arrivés à expiration. Les conditions requises pour qu'un livre tombe dans le domaine public peuvent varier d'un pays à l'autre. Les livres libres de droit sont autant de liens avec le passé. Ils sont les témoins de la richesse de notre histoire, de notre patrimoine culturel et de la connaissance humaine et sont trop souvent difficilement accessibles au public.

Les notes de bas de page et autres annotations en marge du texte présentes dans le volume original sont reprises dans ce fichier, comme un souvenir du long chemin parcouru par l'ouvrage depuis la maison d'édition en passant par la bibliothèque pour finalement se retrouver entre vos mains.

Consignes d'utilisation

Google est fier de travailler en partenariat avec des bibliothèques à la numérisation des ouvrages appartenant au domaine public et de les rendre ainsi accessibles à tous. Ces livres sont en effet la propriété de tous et de toutes et nous sommes tout simplement les gardiens de ce patrimoine. Il s'agit toutefois d'un projet coûteux. Par conséquent et en vue de poursuivre la diffusion de ces ressources inépuisables, nous avons pris les dispositions nécessaires afin de prévenir les éventuels abus auxquels pourraient se livrer des sites marchands tiers, notamment en instaurant des contraintes techniques relatives aux requêtes automatisées.

Nous vous demandons également de:

+ *Ne pas utiliser les fichiers à des fins commerciales* Nous avons conçu le programme Google Recherche de Livres à l'usage des particuliers. Nous vous demandons donc d'utiliser uniquement ces fichiers à des fins personnelles. Ils ne sauraient en effet être employés dans un quelconque but commercial.

+ *Ne pas procéder à des requêtes automatisées* N'envoyez aucune requête automatisée quelle qu'elle soit au système Google. Si vous effectuez des recherches concernant les logiciels de traduction, la reconnaissance optique de caractères ou tout autre domaine nécessitant de disposer d'importantes quantités de texte, n'hésitez pas à nous contacter. Nous encourageons pour la réalisation de ce type de travaux l'utilisation des ouvrages et documents appartenant au domaine public et serions heureux de vous être utile.

+ *Ne pas supprimer l'attribution* Le filigrane Google contenu dans chaque fichier est indispensable pour informer les internautes de notre projet et leur permettre d'accéder à davantage de documents par l'intermédiaire du Programme Google Recherche de Livres. Ne le supprimez en aucun cas.

+ *Rester dans la légalité* Quelle que soit l'utilisation que vous comptez faire des fichiers, n'oubliez pas qu'il est de votre responsabilité de veiller à respecter la loi. Si un ouvrage appartient au domaine public américain, n'en déduisez pas pour autant qu'il en va de même dans les autres pays. La durée légale des droits d'auteur d'un livre varie d'un pays à l'autre. Nous ne sommes donc pas en mesure de répertorier les ouvrages dont l'utilisation est autorisée et ceux dont elle ne l'est pas. Ne croyez pas que le simple fait d'afficher un livre sur Google Recherche de Livres signifie que celui-ci peut être utilisé de quelque façon que ce soit dans le monde entier. La condamnation à laquelle vous vous exposeriez en cas de violation des droits d'auteur peut être sévère.

À propos du service Google Recherche de Livres

En favorisant la recherche et l'accès à un nombre croissant de livres disponibles dans de nombreuses langues, dont le français, Google souhaite contribuer à promouvoir la diversité culturelle grâce à Google Recherche de Livres. En effet, le Programme Google Recherche de Livres permet aux internautes de découvrir le patrimoine littéraire mondial, tout en aidant les auteurs et les éditeurs à élargir leur public. Vous pouvez effectuer des recherches en ligne dans le texte intégral de cet ouvrage à l'adresse `http://books.google.com`

Digitized by Google

3 2044 106 384 233
59
Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

RECHERCHES MICROCHIMIQUES

SUR

QUELQUES GLUCOSIDES

ET

QUELQUES TANINS VÉGÉTAUX

par

Albert GORIS

PRÉPARATEUR DU COURS DE MATIÈRE MÉDICALE
A L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE DE PARIS
PHARMACIEN DU SANATORIUM D'ANGICOURT (OISE)

PARIS
A. JOANIN ET Cie, ÉDITEURS
24, RUE CONDÉ, 24

1903

Digitized by Google

Digitized by Google

A mon collègue Bartbelot
Cordial souvenir
Alfonse

Digitized by Google

Digitized by Google

RECHERCHES MICROCHIMIQUES

SUR

QUELQUES GLUCOSIDES

ET

QUELQUES TANINS VÉGÉTAUX

PAR

Albert GORIS

PRÉPARATEUR DU COURS DE MATIÈRE MÉDICALE
A L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE DE PARIS
PHARMACIEN DU SANATORIUM D'ANGICOURT (OISE)

PARIS
A. JOANIN ET Cie, ÉDITEURS
24, RUE CONDÉ, 24

1903

Digitized by Google

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

	MM.	
Doyen	Paul APPELL.	
Doyen honoraire	Gaston DARBOUX.	
Professeur honoraire	Louis TROOST.	
Professeurs	LIPPMANN	Physique.
	BOUTY	—
	APPELL	Mécanique rationnelle.
	DUCLAUX	Chimie biologique.
	BOUSSINESQ	Physique mathématique et Calcul des probabilités.
	PICARD	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
	H. POINCARÉ	Astronomie mathématique et Mécanique céleste.
	Yves DELAGE	Zoologie, Anatomie, Physiologie comparée.
	Gaston BONNIER	Botanique.
	DASTRE	Physiologie.
	DITTE	Chimie.
	MUNIER-CHALMAS	Géologie.
	GIARD	Zoologie, Évolution des êtres organisés.
	WOLF	Astronomie physique.
	KŒNIGS	Mécanique physique et expérimentale.
	VÉLAIN	Géographie physique.
	GOURSAT	Calcul différentiel et Calcul intégral.
	CHATIN	Histologie.
	PELLAT	Physique.
	HALLER	Chimie organique.
	H. MOISSAN	Chimie.
	JOANNIS	Chimie (Enseignement P. C. N.).
	P. JANET	Physique.
	N...	Zoologie, Anatomie, Physiologie comparée.
	WALLERANT	Minéralogie.
Professeurs adjoints	PUISEUX	Mécanique et Astronomie.
	RIBAN	Chimie analytique.
	RAFFY	Analyse et Mécanique.
	LEDUC	Physique.
	HAUG	Géologie.
	HADAMARD	Calcul différentiel et Calcul intégral.
	ANDOYER	Astronomie mathématique et Mécanique céleste.
Secrétaire	A. GUILLET.	

MICROFILMED AT HARVARD

Digitized by Google

A LA MÉMOIRE

DE GUSTAVE PLANCHON

MON REGRETTÉ MAITRE

Digitized by Google

Digitized by Google

A MONSIEUR

LE PROFESSEUR E. PERROT

Hommage respectueux et témoignage de vive gratitude.

Digitized by Google

À MES PARENTS ET AMIS

Digitized by Google

INTRODUCTION

Nous nous étions proposé, au début de ce travail, de déterminer microchimiquement moins le mode de répartition du tanin dans diverses plantes, que l'époque de son apparition et surtout son mode de formation.

Les premières recherches entreprises, ayant fourni des résultats insuffisamment précis et difficiles à coordonner, nous ont entraîné vers un but un peu différent. Un hasard heureux nous fit choisir le Marronnier comme sujet d'étude, et nous nous trouvâmes bientôt en présence de faits qui retinrent notre attention.

La localisation du tanin dans la tige d'*Æsculus* n'offre rien de bien différent des résultats observés avec d'autres plantes ; mais les réactions microchimiques entreprises pour fixer la répartition de l'esculine amenèrent bientôt à cette conclusion, que le glucoside se trouve situé dans des cellules semblables, sinon identiques, à celles qui renferment le tanin. Chercher une réaction sûre permettant de localiser facilement et avec netteté l'esculine, déterminer les conditions d'action du réactif furent dès lors l'objet de nos nouvelles recherches.

En possession d'une technique que nous croyons irréprochable, il était facile de se rendre compte de l'évolution du tanin dans la plante en suivant pas à pas le développement de l'embryon.

Digitized by Google

La lumière pouvant jouer un très grand rôle dans la formation de cette substance, il importait d'étudier son action sur de jeunes plantes ou des germinations complètement développées à l'obscurité.

Nous avons ainsi obtenu une première série de résultats que l'on trouvera consignés dans le second chapitre.

La recherche et la localisation du tanin ne présentaient guère de difficultés, mais il nous a fallu démontrer par une expérience aussi convaincante que possible que le tanin et l'esculine se trouvent réunis côte à côte dans les mêmes cellules. Ces deux produits existent-ils simplement dans ces éléments ou bien, au contraire, forment-ils entre eux une combinaison partielle ou totale ?

C'est là une question intéressante qui nous a entraîné un peu en dehors du sujet, mais qu'il importait de fixer, et par suite a forcé à quelques incursions dans le domaine de la chimie. Ces recherches prouveront que l'esculine et l'acide esculitannique forment un composé complexe, un tanno-glucoside (voisin des doubles glucosides) — *doppelglycoside* — d'Aweng, qui est le véritable tanin physiologique existant dans la plante.

La même série d'études fut appliquée à des plantes renfermant des composés de formule voisine de celle de l'esculine ou totalement différente de cette dernière. Nous avons pu déterminer les méthodes de localisation de ces produits et montrer leur coexistence avec le tanin dans des cellules spéciales.

Nous nous sommes adressé surtout aux végétaux renfermant des glucosides connus, tels que la fraxine, la daphnine, la fustine, la salicine ou des composés spéciaux, tels que la caféine.

Dans toute cette étude nous nous sommes attaché à exposer avec un soin minutieux, sans crainte de répétition parfois fastidieuse, les méthodes qui nous ont servi à ces recherches et qui ont donné les meilleurs résultats. En un mot, nous nous sommes efforcé de mettre entre les mains des travailleurs qui aborderont ces questions spéciales une technique aussi parfaite que possible.

Ce mémoire comprend quatre parties divisées de la manière suivante :

Digitized by Google

PREMIÈRE PARTIE

Des méthodes de localisation des principes actifs chez les végétaux.

DEUXIÈME PARTIE

Recherches sur l'Æsculus Hippocastanum et le Pavia rubra :

Chapitre premier. — De l'**Esculine**, propriétés et réactions qui permettent sa localisation.

Chapitre II. — Localisation spéciale de l'Esculine dans les tissus des organes de l'*Æsculus Hippocastanum*.

Chapitre III. — Répartition des cellules à esculine dans les tissus des différents organes de l'*Æsculus Hippocastanum*.

Chapitre IV. — **Acide esculitannique**. Sa répartition dans le végétal. Ses rapports avec l'esculine.

Chapitre V. — De l'esculine dans le *Pavia rubra*.

TROISIÈME PARTIE

Recherches concernant d'autres glucosides :

Chapitre premier. — Localisation de la **Fustine** dans le *Rhus cotinus* L.

Chapitre II. — Localisation de la **Fraxine** dans le *Fraxinus excelsior* L.

Chapitre III. — Localisation de la **Daphnine** dans le *Daphne alpina* L.

Chapitre IV. — Localisation de la **Salicine** dans le *Salix alba* L.

Chapitre V. — Essais de localisation de la **Caféine** dans le *Thea sinensis* L. et le *Cola acuminata* R. Br.

QUATRIÈME PARTIE

Conclusions.

Digitized by Google

Ce travail a été fait au laboratoire de Matière médicale de l'Ecole supérieure de pharmacie de Paris et, pour quelques expériences chimiques. au laboratoire de M. Haller, à la Sorbonne, où nous avons reçu la plus bienveillante hospitalité.

M. G. Planchon encouragea nos premières recherches et nous porta un si grand intérêt qu'en témoignage de nos sentiments de respectueuse gratitude nous dédions ce travail à la mémoire de notre regretté Maître.

Nous remercions bien sincèrement son successeur, M. E. Perrot, qui, en nous laissant l'indépendance la plus complète, nous a guidé de ses conseils, soutenu de ses encouragements précieux, et nous lui témoignons toute notre reconnaissance pour la bienveillante sollicitude dont il n'a cessé de nous entourer.

C'est aussi pour nous un agréable devoir d'adresser nos remerciements à notre ami Charon, chef du laboratoire de chimie organique à la Sorbonne, pour les nombreux conseils techniques qu'il nous a prodigués pendant le cours de nos recherches chimiques, à M. le docteur Dorveaux, le savant bibliothécaire de l'Ecole de pharmacie, pour l'intérêt qu'il nous a témoigné, ainsi qu'à M. Gillot, le sous-bibliothécaire, pour la complaisance avec laquelle il s'est mis à notre disposition pendant nos recherches bibliographiques.

M. le professeur Bræmer nous a également fourni de nombreuses indications bibliographiques concernant les tanins, qu'il veuille bien recevoir ici l'expression de nos sincères remerciements.

Enfin, n'oublions pas non plus MM. Henry, chef de culture au Museum, Demilly, jardinier-chef de l'Ecole de pharmacie, Cail et Jérome, jardiniers du Museum, pour le gracieux concours qu'ils nous ont prêté, ainsi que les dessinateurs MM. Bonard et Duval, qui ont apporté le plus grand soin dans l'exécution délicate des planches et dessins qui accompagnent notre texte.

Digitized by Google

PREMIÈRE PARTIE

DES MÉTHODES DE LOCALISATION DES PRINCIPES ACTIFS CHEZ LES VÉGÉTAUX

Depuis quelques années on s'est occupé de déterminer dans quels éléments des divers tissus de la plante s'accumulaient de préférence les substances formées par les nombreuses actions chimiques qui se produisent dans le végétal, pendant le cours de son existence. De là toutes ces publications concernant la localisation, dans les tissus des végétaux, des substances les plus diverses (alcaloïdes, glucosides, ferments solubles), qui enrichissent chaque jour la littérature botanique.

Presque toujours l'étude de la localisation est basée sur les caractères chimiques de la substance, et de telles recherches nécessitent la connaissance des propriétés chimiques du composé et de ses réactions applicables à la localisation cellulaire. Les méthodes microchimiques sont par suite les seules employées en localisation.

Un certain nombre d'observateurs ont employé dans un autre but les réactions chimiques pour la recherche de certaines substances, telles que la caféine ; mais ainsi on n'obtient pas ce qu'on peut appeler une localisation, mais seulement une preuve certaine de la présence du produit dans le végétal.

Une localisation vraie consiste, non seulement à affirmer la présence de la substance que l'on soupçonne, mais encore à déterminer d'une façon précise dans quels tissus, et même dans quelles cellules, cette substance se rencontre à l'exclusion d'autres éléments.

Digitized by Google

Errera (1), si compétent en ce genre de travaux, a déjà défini le rôle des réactifs en localisation.

« Que l'on regarde un précipité à l'œil nu, à la loupe ou au microscope, le résultat est toujours le même. Le caractère essentiel de la microchimie consiste non dans la recherche de petites quantités, mais dans leur localisation. »

Les méthodes actuellement usitées sont peu nombreuses et variables avec chaque plante.

Il faut ranger en première ligne, et comme fournissant les meilleurs résultats, les réactions colorées. Elles ne sont malheureusement pas applicables dans tous les cas, soit à cause de la trop petite quantité de produits réagissant, soit par suite de l'action destructive du réactif sur les tissus du végétal. Elles ont été employées avec succès par Errera, Maistriau, Clautriau, Guignard, L. Sauvan. Ces méthodes ont permis également de conduire ce travail à bonne fin.

Une deuxième méthode consiste à provoquer, dans la cellule, la précipitation du corps à caractériser, soit sous forme de sel, comme pour la berbérine que l'on fait cristalliser à l'état de nitrate, soit en le faisant cristalliser directement dans la cellule qui le contient [inuline, tyrosine (2), etc.].

Enfin, la méthode la plus générale qui ait permis à ces études de prendre une si grande extension a été proposée par Errera en 1889.

Elle consiste à plonger les coupes dans un réactif approprié — le plus souvent, l'iodure de potassium ioduré — et à examiner le précipité formé ; on recommence l'expérience sur des coupes débarrassées de l'alcaloïde par un séjour dans l'alcool tartrique à 5 p. 100. L'examen différentiel des deux préparations indique le lieu de l'élection de l'alcaloïde.

Ce procédé a donné de bons résultats à Errera et à ses élèves,

(1) Errera, Maistriau, Clautriau. Premières recherches sur la localisation et la signification des alcaloïdes dans les plantes. Bruxelles, 1887. *An. Soc. belge microsc.*, t. XII, 1885-86.

(2) Em. Bourquelot et V. Harlay. Sur la recherche et la présence de la tyrosine dans quelques champignons. *Bull. Soc. Myc. de France*, t. XII, p. 153-156, 1896. *Journal Pharm. Chim.*, 6e sér., t. IV, p. 549-551, 1896.

Digitized by Google

ainsi qu'à Guérin, et de même à Molle et Lotsy dans la localisation des alcaloïdes des quinquinas.

Dans nos recherches, cette méthode ne nous sert que de moyen de contrôle : nous lui préférons de beaucoup les méthodes de coloration.

Déjà Kielmeyer et Kœstlin (1) en 1808, alors que les alcaloïdes étaient à peine connus, avaient entrepris la lourde tâche de déterminer le siège de ces principes dans quelques végétaux.

En 1849, Bœdeker (2) obtenait des cristaux de nitrate de berbérine dans les membranes cellulaires de la racine de *Berberis vulgaris* L. et de *Menispermum palmatum* (*Coculus palmatus*) ; en 1874, Howard (3) signalait l'existence problématique de cristaux de quinine dans les couches les plus externes de l'écorce des quinquinas.

Le botaniste russe Borscow (4) est le premier qui ait employé réellement des réactions microchimiques à l'étude de la répartition des principes actifs dans les plantes. Son travail, admirablement conçu pour l'époque, porte sur l'étude de l'*asarone*, la *syringine*, la *franguline*, l'*acide chrysophanique* et la *vératrine*. Cet auteur décrit les méthodes employées avec les détails les plus circonstanciés, aussi tout observateur peut répéter avec les plus grandes chances de succès les expériences dont il expose les résultats. Très fréquemment, les différents auteurs qui se sont occupés de localisation de principes végétaux oublient de préciser la méthode employée, et il n'est pas rare, même pour un observateur habitué à ce genre de recherches, de se trouver dans l'impossibilité de répéter l'expérience décrite.

Évidemment ces auteurs ont oublié de donner dans la marche de la méthode quelques indications particulières dont dépend sa réussite. On ne devrait donc jamais hésiter à donner les plus nombreux détails sur les difficultés à résoudre.

(1) Kielmeyer et Kœstlin. *De materiis narcoticis regni vegetabilis earumque ratione botanica.* Tubingen, 1808.

(2) Bœdecker. Chemisch-physiologische Untersuchung einiger Stoffe aus der Familie der Menispermeen. *Annal. d. Chem. u. Pharm.*, t. LXIX, p. 371, 1849.

(3) Howard. *The quinology of the East Indian plantations.* London, 1869, p. 7, pl. II.

(4) Borscow. Beiträge zur Histochemie der Pflanze. *Bot. Zeit.*, t. XXXII, p. 17-25, 33-40, 1874.

Digitized by Google

La même année, en 1874, PFEFFER (1) publia quelques résultats, malheureusement bien incomplets, obtenus en ce qui concerne la localisation de l'hespéridine.

Ces quelques publications avaient attiré l'attention des botanistes ; aussi l'année suivante l'Ecole de pharmacie imposa-t-elle au concours d'agrégation le sujet nouveau : « Du siège des substances actives dans les plantes médicinales. » Dans un travail bien compris J. CHATIN (2) résuma d'une façon méthodique toutes les connaissances acquises sur ce sujet ; il insista particulièrement sur les résultats obtenus par HOWARD, et l'auteur ne manqua pas de faire ressortir tout l'intérêt qui s'attachait à cette question.

En 1876, HERMANN (3) caractérise microchimiquement la berbérine. En 1879, ESSMANOFFSKY (4) publie quelques recherches sur un produit cristallisé, alcaloïde dit-il, qu'il obtient cristallisé en sphérocristaux, dans les canaux mucilagineux de certains *Canna*.

En 1884, signalons un travail de SCHAARSMIDT (5) sur la localisation de la solanine dans le *Solanum nigrum*, *S. tuberosum*, *S. dulcamara*, *Lycopersicum esculentum*; de ROSOLL (6), sur la strychnine et enfin de LINDT (7), sur la strychnine et la brucine.

En somme, depuis BORSCOW, les progrès dans les études microchimiques étaient peu importants ; aussi l'apparition du travail dû à la collaboration de ERRERA, MAISTRIAU, CLAUTRIAU (8) vint-elle donner une impulsion énergique à ce genre de recherches très importantes pour les divers problèmes d'ordre physiologique et biologi-

(1) W. PFEFFER. Hesperidin, ein Bestandtheil einiger Hesperideen. *Bot. Zeit.*, t. XXXII, p. 529-539, 1874.

(2) J. CHATIN. *Du siège des substances actives dans les plantes médicinales.* 173 pages in-8°. Paris, 1876.

(3) O. HERMANN. *Nachweis organ. Verbindungen in vegetabil. Geweben.* Dissert. Leipzig, 1876.

(4) Jos. ESSMANOFFSKY. Untersuchung der Saftgänge und der in ihnen vorkommenden eigenthümlichen Niederschläge bei *Canna*. Analyse tirée de *Just Bot. Jahr.*, t. VII, I. Abth., p. 10, 1879.

(5) SCHAARSCHMIDT. Uber d. mikrochem. Reaction des Solanin. *Zeitschr. f. wis. Mikroskopie*, t. I, p. 61-62, 1884.

(6) ROSOLL. Beiträge z. Histochemie d. Pflanze. *Sitzgsb. Ak. wiss. Wien.*, t. 89,I, p. 137-150, 1884, et *Monatshefte für Chemie*, 1884, 94-107.

(7) LINDT. Uber d. mikrochem. Nachweis von Brucin u. Strychnin. *Zeitschr. f. wiss. Mikrosk.*, t. 1, p. 237-240, 1884.

(8) ERRERA, MAISTRIAU, CLAUTRIAU. *Loc. cit.*

Digitized by Google

que. Ce travail a trait à la localisation de la **colchicine**, de la **nicotine**, de l'**aconitine** et d'un alcaloïde nouveau existant dans le *Narcissus*, signalé en 1877, par Gerrard, et qui ne fut isolé que plus tard, en 1889, par de Wèvre (1).

Deux ans après, Errera (2) indiqua sa méthode générale de localisation des alcaloïdes et à la même époque paraissaient un mémoire de Clautriau (3) sur la recherche microchimique et la « marche des alcaloïdes » dans le *Papaver somniferum* L., et un travail de de Wèvre (4) sur la localisation de l'atropine. Citons encore la localisation du tissu aloïfère due à Macqret (5), mais qui avait déjà été l'objet, de la part de Trecul (6), d'une communication retentissante à l'Académie des sciences, intitulée sur le « suc propre des feuilles d'aloès ».

Enfin, E. de Willdeman (7) étudie la présence et la localisation d'un alcaloïde dans quelques Orchidées, alcaloïde que l'on ne connaissait pas à l'état libre. « Ici, dit Errera, comme pour le *Narcissus*, la microchimie avait devancé la chimie. »

En France, la localisation des alcaloïdes n'attirait pas encore les travailleurs, et cependant les méthodes microchimiques furent bientôt appliquées à des recherches d'un nouveau genre ; Blondel (8) étudia le mode de production du parfum dans les roses, et Mesnard (9),

(1) A. de Wèvre. Sur l'alcaloïde des Narcisses. *Bull. Soc. belge de microsc.*, t. XIII, p. 137-140, 1889.

(2) Errera. Sur la distinction microchimique des alcaloïdes et des matières protéiques. *Ann. Soc. belge de microsc.*, t. XIII, fasc. 2, p. 73-121, 1889.

(3) G. Clautriau. Recherches microchimiques sur la localisation des alcaloïdes dans le *Papaver somniferum*. *Ann. Soc. belge de microsc.*, t. XII, 1888, p. 67-85.

(4) A. de Wèvre. Localisation de l'atropine. *Bull. Soc. belge de microsc.*, t. XIV, p. 19, 1889.

(5) Fr. Macqret. *Étude sur l'aloès*. Th. pharm., Paris, 1888.

(6) A. Trecul. Du suc propre dans les feuilles d'aloès. *C. R. Ac. Sc.*, t. LXXII, p. 520-531, 1871. *Ann. Sc. nat.*, 5e sér., t. XIV, p. 80-90. 1871.

(7) E. de Wildeman. Présence et localisation d'un alcaloïde dans quelques Orchidées. *Bull. de la Soc. belge de microsc.*, t. XVIII, p. 101-112. 1892.

(8) R. Blondel. Sur le parfum et son mode de production dans les roses. *Bull. Soc. bot.*, t. XXXVI, p. 107-113, 1889.

R. Blondel. *Les Produits odorants des rosiers*. 163 pages in-4°, 1 planche. Paris, 1889.

(9) E. Mesnard. Recherches sur les modes de production des parfums dans les fleurs. *C. R. Ac. Sc.*, t. CXV, p. 892-895, 1892.

E. Mesnard. Recherches sur la formation des huiles grasses et des

Digitized by Google

poursuivant cette étude quelques années plus tard, l'étendit au mode de production des parfums dans les fleurs en général.

Les matières albuminoïdes n'avaient été encore l'objet d'aucunes recherches. Il existait cependant quelques publications spéciales de Zacharias (1), Kraser (2), Klebs (3), Reisch et Mikosch (4) qui étaient plutôt des études chimiques sur les matières albuminoïdes dans les plantes que des recherches sur la localisation de ces principes.

En 1890 furent publiées les belles recherches de Guignard (5). Il put localiser avec netteté l'émulsine dans les amandes amères et le laurier-cerise, et la myrosine dans les Crucifères. Ces travaux furent suivis de publications du même ordre sur les Capparidées, Tropéolées et sur les plantes du genre *Manihot*. Exposées avec détail et un soin minutieux, ces localisations peuvent facilement être répétées par des observateurs inexpérimentés; et par leur netteté et leur précision elles sont devenues classiques.

Un travail de Spatzier (6), paru entre la publication de ces deux

huiles essentielles dans les végétaux. *Ann. Sc. nat.*, 7e sér., t. XVIII, 257-398, 1893.

(1) E. Zacharias. Uber Eiweiss, Nuklein und Plastin. *Bot. Zeit.*, t. XLI, p. 209-215, 1883.

(2) F. Krasser. Untersuch. Uber das Vorkommen von Eiweiss in der pflanz. Zellhaut nebst Bemerkungen über den mikroch. Nachweis der Eiweisskörper. *Sitzung. d. k. Akad. d. wiss. zu Wien.* t. XCIV, p. 118, 1886.

(3) Klebs. Einige Bemerkungen zu der Arbeit von Krasser. « Untersuch. uber das Vorkommen von Eiweiss inder pflanzlichen Zellhaut. » *Bot. Zeit.*, 1887, t. VL, p. 697-768.

(4) C. Reisch und C. Mikosch. Uber Eiweiss reaktionen und deren mikroch. Anwendung. *Jahresb. d. K. K. Oberrealschule.* I, *Bezirke von Wien*, 1890.

(5) L. Guignard. Recherches sur la localisation des principes actifs des Crucifères. *Journ. bot.*, t. IV, p. 385-394, 412-430, 435-455, 1890.

L. Guignard. Sur la localisation dans les amandes et le laurier-cerise des principes qui fournissent l'acide cyanhydrique. *Journ. pharm. et chim.*, 5e sér., t. XXI, p. 233-236, 289-303, 1890.

L. Guignard. Recherches sur la nature et la localisation des principes actifs chez les Capparidées, Tropéolées, Limnanthées, Résédacées, Papayacées. *Journ. bot.*, t. VII, p. 345-364, 393-408, 417-426, 444-460, 1893.

L. Guignard. Recherches sur certains principes encore inconnus chez les Papayacées. *Journ. Bot.*, t. VIII, p. 67-79, 85-92, 1894.

L. Guignard. Sur l'existence et la localisation de l'émulsine dans les plantes du genre Manihot. *Bull. Soc. bot.*, t. XLI, p. 103-107, 1894.

(6) Wilhelm Spatzier. Uber das Auftreten und die physiologische Bedeutung des Myrosins inder Pflanze. *Pringhs. Jahr.*, t. XXV, p. 39-78, 1893.

Digitized by Google

mémoires, critiquait les observations de GUIGNARD, dont la deuxième étude sur les Capparidées est une réponse absolument convaincante aux arguments de l'auteur allemand.

A ces localisations DE WÈVRE (1) ajouta une étude sur la technique microscopique de la recherche des albuminoïdes.

Sous l'impulsion ainsi donnée par ces résultats intéressants, il parut jusqu'en 1895 toute une série de publications. Ce sont d'abord celles de WOTHTSCHALL (2), sur la solanine, de ROSOLL (3), sur la brucine, de G. DE ISTWANFI (4), sur la capsicine, de ANEMA (5), sur l'atropine, de GEROCK et SKIPARI (6), sur la strychine.

L. BRÆMER (7), en étudiant la localisation des principes actifs des Cucurbitacées, nous a fait connaître des éléments, jusqu'alors inconnus dans ces plantes (laticifères, analogues à ceux des Campanulacées), qui renferment les glucosides caractéristiques de ces espèces. Signalons enfin un travail de VILLENEUVE (8), sur le Redoul (*Coriaria myrtifolia* L.).

En 1895 nous devons enregistrer les travaux suivants : P. GUERIN (9) localise l'anagyrine et la cytisine dans l'*Anagyrus fœtida* L.

(1) A. DE WÈVRE. Recherches sur la technique microchimique des albuminoïdes. *Bull. Soc. belge de microsc.*, t. XX, p. 91-120, 1894.

(2) E. WOTHTSCHALL. Zur Frage über die Verbreitung und Vertheilung des Solanins in den Planzen. *Arbeit. d. Nat. Ver. zu Kasan*, t. XVIII, 103, 74 pages, 1889. Analysé in *Bot. Centralbl.*, t. XLI, p. 100-103, 1890.

E. WOTHTSCHALL. Uber die mikroch. Reactionen des Solanins. *Zeitschr. für wiss. Mikroskopie*, t. V, p. 19-38, 182-195.

(3) A. ROSOLL. *Uber den mikroch. Nachweis der Glycoside und Alkaloid in den veget. Gewehen.* Stockerau, 1889-1890 (Jahresb. des Landes-Realgymnasiums, zu Stockerau).

(4) G. ISTWANFFI. Recherches sur la localisation de la substance active dans le piment. *Termeszétrajzi Füzetek*, t. XIV, p. 197-199, 1891. Analysé dans *Zeits. f. wiss. Mikrosp.*, t. IX, p. 271, 1892.

(5) P. ANEMA. De zetel der Alkaloiden bij enkele narkotische Planten. Utrecht, 1892. Analysé in *Jahr. d. Pharm.*, 1892, p. 197-198.

(6) GEROK et SKIPARI. Uber den Sitz der Alkaloide in Strychnos-samen *Arch. d. Pharm.*, t. CCXXX, p. 555-560, 1892.

(7) L. BRÆMER. De la localisation des principes actifs des Cucurbitacées. Recherches histologiques et histochimiques. *C. R. Ac. Sc.*, t. CXVII, 753-754, 1893 — Toulouse, 58 pages in-8°, 7 pl., 1893.

(8) VILLENEUVE. Étude sur le Redoul (*Coriaria myrtifolia*), p. 30-32. 62 pages in-4°. Montpellier, 1893.

(9) P. GUERIN. *Recherches sur la localisation de l'anagyrine et de la cytisine.* 62 pages in-8°. 6 pl. *Th. pharm.* col. Paris, 1895.

Digitized by Google

et le *Cytisus laburnum*, L. SAUVAN (1) publie ses résultats sur la localisation de l'helléborine, de la brucine, strychnine, taxine, daphnine, etc., L. GAUCHER (2) expose ses recherches microchimiques sur la caféine et l'acide cafétannique.

Ajoutons encore les travaux de ELFSTRAND (3) sur les alcaloïdes des Loganiacées, de LUTZ (4) sur le principe actif des séneçons, et de PH. MOLLE (5) sur les alcaloïdes des Solanées.

Signalons, les années suivantes, les travaux de DE DROOG (6) sur les alcaloïdes des Orchidacées, et les importantes recherches de TREUB (7) sur la localisation, le transport et le rôle de l'acide cyanhydrique dans le *Pangium edule* REINW. A la suite de cette publication, LUTZ (8) étudie la localisation de l'acide cyanhydrique chez les Pomacées et chez l'*Eriobotrya japonica* LINDT.

(1) L. SAUVAN. Recherches sur la localisation des principes actifs dans l'*Helleborus fœtidus*. *Répertoire de pharm.*, 3e sér., t. VI, 529-530, 1895.

L. SAUVAN. Recherches sur la localisation de la brucine et de la strychnine dans les semences de *S. nux vomica*, *S. Ignatii*, *S. Gautheriana*. *Journ. pharm. chim.*, 6e sér., t. I, p. 496-498, 1895.

L. SAUVAN. Localisation des principes actifs dans les végétaux. *J. bot.*, t. X, p. 126-132, 133-140, 157-162, 1896.

L. SAUVAN. Recherches sur la localisation de la daphnine dans les *Daphne Alpina* et *D. Gnidium*. *Journ. pharm. chim.*, 6e sér., t. III, 443-445, 1896.

(2) L. GAUCHER. *De la caféine et de l'acide cafétannique dans le caféier* (recherches microchim. *Th. pharm.* Montpellier, 1895.

(3) M. ELFSTRAND. *Studier öfver Alkaloidernas lokalisation foreträdesvis inom familjen Loganiaceæ*. Upsala, 1895.

(4) L. LUTZ. Localisation des principes actifs dans les seneçons. *Bull. Soc. bot.*, t. XLII (3e s., II), p. 486-488, 1895.

(5) PH. MOLLE. Recherches de microchimie comparée sur la localisation des alcaloïdes dans les Solanacées. 60 pages in-8°, 1 pl. *Extrait du tome LIII des Mémoires couronnés et autres Mémoires publiés par l'Acad. royale de Belgique*, 1895.

(6) DE DROOG. Contribution à l'étude de la localisation microchimique des alcaloïdes dans la famille des Orchidacées. *Mémoires couronnés et autres Mémoires publiés par l'Acad. royale de Belgique*, t. LV, 1896-1897.

(7) M. TREUB. Sur la localisation, le transport et le rôle de l'acide cyanhydrique dans le *Pangium edule*. REINW. *Ann. du Jard. bot. de Buitenzorg.*, t. XIII, p. 1-85, 11 pl. col., 1896.

(8) L. LUTZ. Sur la présence et la localisation dans les graines d'un certain nombre de Pomacées des principes fournissant l'acide cyanhydrique. *Union pharm.*, t. XXXVIII, p. 193-198, 1897.

L. LUTZ. Sur la présence et la localisation dans les graines de l'*Eriobo-*

Digitized by Google

En 1898, Lotsy (1) publie son important travail sur les quinquinas, complété par les recherches postérieures de Charpentier (2). Cette publication du savant hollandais et les travaux de Borscow, Errera, Guignard, marquent les étapes successives dans la marche d'une méthode née d'hier, cependant si féconde en résultats intéressants, et dont l'importance n'échappe à personne.

Signalons encore les études de Barth (3), qui propose une nouvelle méthode microchimique consistant à faire agir l'iode ou le brome en vapeur sur les coupes dans lesquelles on recherche l'alcaloïde ; le mémoire de Cador (4) sur la caractérisation de la caféine dans le maté, qui n'est pas une localisation au sens où nous l'entendons.

Depuis, Raciborsky (5) a aussi utilisé les méthodes microchimiques pour la localisation des matières oxydantes dans les plantes. Lecomte (6) a localisé la vanilline ; L. Grès (7), les principes actifs des Rhamnées, et Vanderlinden (8) a étudié la répartition des alcaloïdes et des glucosides dans la famille des Renonculacées.

Irya Japonica des principes fournissant l'acide cyanhydrique. *Bull. Soc. bot.*, t. XLIV, p. 263-265, 1897.

(1) Lotsy. De Localisatie van het alcaloid in *Cinchona Calisaya Ledgeriana* en in *C. succirubra*. *Mededeelingen van de Laboratoria der Gouvernement's kinaonderneming*. Batavia, 1898, 128 p. avec 36 figures et 20 planches colorées.

(2) Charpentier. *Étude anatomique et microchimique des quinquinas de culture*. 50 pages in-8°. *Th. pharm.*, Paris, 1900, p. 40-41.

(3) H. Barth. Studien über den mikroch. Nachweis von Alkaloiden in Arzneidrogen. *Arch. d. Pharm.*, t. CCXXXVI, p. 354-367, 1898.

(4) Cador. Anatomische Untersuchung der Mateblätter. *Bot. Centralb.*, t. LXXXIV, p. 250, 1900.

(5) Raciborsky. Ein Inhaltskörper des Leptoms. *Ber. d. d. Bot. Gessellsch.*, XVI, p. 52-63, 1898, et Weitere Mittheilungen über das Leptomin, *ibid*,. XVI, p. 119-123, 1898. Analysé in *Journ. pharm. chim.*, 6e sér., t. IX, 387-390, 1899.

(6) H. Lecomte. Sur la formation du parfum de la vanille. *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXIII, p. 745-748, 1901.

(7) L. Grès. *Contribution à l'étude anatomique et microchimique des Rhamnées*, 95 pages in-8°, 2 pl. *Th. pharm.* Paris, 1901.

(8) E. Vanderlinden. Recherches microchimiques sur la présence des alcaloïdes et des glycosides dans la famille des Renonculacées. *Ann. Soc. royale des sc. méd. et nat. de Bruxelles*, t. X, fasc. I, 1901. 50 pages in-8°, 2 pl. colorées.

Digitized by Google

Enfin, il y a quelques mois, AUDEMARD (1) démontra microchimiquement, dans les fleurs du *Spartium junceum*, la présence d'un alcaloïde qui est peut-être le principe très dangereux ayant déjà produit des accidents regrettables sur lesquels E. PERROT (2) a attiré l'attention du corps médical.

Les ouvrages généraux s'occupant des questions de localisation sont peu nombreux, et nous ne connaissons guère que le mémoire de F. JADIN (3) sur le « siège des principes médicamenteux dans les végétaux », sujet de nouveau proposé par l'Ecole de pharmacie au concours d'agrégation de 1893. Dans ce travail, l'auteur consacre exclusivement un chapitre aux recherches faites depuis la thèse de J. CHATIN (4) sur la localisation des principes actifs. Les ouvrages spéciaux de POULSEN (5), MOLISCH (6), malgré leur titre, ne répondent pas entièrement à ce que l'on entend par recherches microchimiques.

La répartition des tanins dans les végétaux n'a jamais fait l'objet d'une étude particulière ; par contre, l'étude des réactions de ces composés a été l'objet de nombreuses notes. Il suffit, pour se rendre compte de l'importance des travaux publiés sur cette partie du sujet, de parcourir le mémoire de BRÆMER (7) ou l'ouvrage de TRIMBLE (8).

Mais existe-t-il dans les végétaux une relation intime entre les alcaloïdes et le tanin qu'ils peuvent contenir ? C'est une question

(1) A. AUDEMARD. Présence et localisation des alcaloïdes dans les organes floraux du *Spartium junceum*. *Bull. pharm. S.-E.* Montpellier, t. VII, p. 40-42, 1902.

Recherches sur la localisation des alcaloïdes dans les genêts (Étude microchimique). *Th. pharm.*, Montpellier, 1902, in-8° de 68 p..

(2) E. PERROT. Sur une substitution dangereuse des fleurs de genêt d'Espagne à celles du genêt à balais. *Journ. pharm. chim.*, 6e sér., t. XIV, p. 19-21, 1901.

(3) F. JADIN. *Du siège des principes médicamenteux dans les végétaux*, 154 pages in-4°. Montpellier, 1894.

(4) J. CHATIN. *Loc. cit.*

(5) POULSEN. *Microchimie végétale*. Édition française. Paris, 1883.

(6) H. MOLISCH. *Grundriss einer Histochemie der pflanzlichen Genussmittel*, 65 pages in-8°. Iéna, 1891.

(7) L. BRÆMER. *Les tannoïdes*. Toulouse, 154 pages in-4°, 1890.

(8) TRIMBLE. *The Tannins*. 2 vol. in-12. Philadelphie, 1892.

Digitized by Google

qui n'a préoccupé aucun des auteurs précédents. L. Guignard (1), toutefois, a signalé la présence de ce dernier corps dans les cellules à émulsine du laurier-cerise.

L. Gaucher (2), dans un travail sur la caféine et l'acide cafétannique avait bien quelque peu envisagé la question, mais ses résultats sont trop incertains pour permettre une conclusion quelconque.

Lotsy (3), dans ses recherches sur la localisation des alcaloïdes du quinquina, est affirmatif en ce qui concerne la présence, dans les cellules à quinine, d'un composé tannique. Charpentier (4) prétend au contraire que le tanin est localisé exclusivement dans « des cellules laticifères » et par conséquent séparé de l'alcaloïde. « Comment, dit-il, expliquer cette opinion généralement admise que les alcaloïdes se trouvent dans les quinquinas à l'état de quinates et quinotannates ; ou bien cette théorie est erronée, ou bien la formation de cette combinaison n'a lieu qu'après la mort de la plante et par suite d'échanges osmotiques qui ne pourraient se produire pendant la vie. »

Dans un mémoire récent, Reimers et Goris (5) ont montré que, contrairement à l'opinion de Charpentier, il existait dans les cellules à alcaloïde un tanin particulier, et que si sa connaissance avait échappé à ce chercheur, cela provenait de l'emploi d'un réactif incertain. Le perchlorure de fer trop dilué ne donne en effet aucune réaction dans ces conditions, tandis qu'employé après dilution au 1/4 et contrôlé par tous les autres réactifs du tanin, on obtient un précipité dans toutes les cellules à alcaloïde. Bien plus, ces auteurs admettent que le tanin contenu dans les cellules (improprement appelées laticifères) est différent de celui que renferment les cellules à alcaloïde. Ce tanin se résinifie facilement à l'air et communique des propriétés fâcheuses à certaines écorces de

(1) L. Guignard. *Loc. cit.*
(2) L. Gaucher. *Loc. cit.*
(3) Lotsy. *Loc. cit.*
(4) Charpentier. *Loc. cit.*, p. 40-41.
(5) Goris et Reimers. Recherches microchimiques sur les Quinquinas. *Bull. sc. pharm.*, t. III, p. 284-299, 1901.

Digitized by Google

quinquinas. Ils appellent ces éléments (*cellules tannifères*) et les rapprochent des organes analogues que l'on rencontre chez le sureau.

Tel est, brièvement exposé, l'état actuel de nos connaissances sur la localisation des principes actifs dans les végétaux.

Digitized by Google

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR L'ÆSCULUS HIPPOCASTANUM ET LE PAVIA RUBRA

CHAPITRE PREMIER

DE L'ESCULINE

PROPRIETES ET RÉACTIONS QUI PERMETTENT SA LOCALISATION

Avant d'exposer avec détail la technique appropriée à la détermination des régions où se localise l'esculine, il n'est pas sans importance d'indiquer sommairement les caractères de ce corps et d'en rechercher les réactions qui pourront être utilisées dans cette étude.

L'esculine, découverte par MINOR, est un glucoside non azoté que l'on retire de l'écorce du Marronnier d'Inde (*Æsculus Hippocastanum* L.) (1).

C'est une poudre blanche, floconneuse, formée d'aiguilles prismatiques, souvent groupées autour d'un point central. Elle cristallise avec une molécule 1/2 d'eau qu'elle perd vers 120, 130°. Elle fond

(1) L. SONNENSCHEIN l'aurait rencontrée dans la racine de *Gelsemium sempervirens*. AIT.

Digitized by Google

vers 160° et subit à cette température un commencement d'altération. Sans odeur, d'un goût faiblement amer, elle est soluble dans 672 parties d'eau à 10°, dans 576 parties à 28° et dans 92 parties d'eau bouillante. Sa solution aqueuse présente une fluorescence bleue extrêmement intense que les acides minéraux font disparaître, tandis que les alcalis la rétablissent en colorant le liquide faiblement en jaune. Cette fluorescence se manifeste avec beaucoup plus d'intensité si l'on substitue l'eau de source à l'eau distillée ; elle disparaît à la longue. C'est une des réactions les plus sensibles de l'esculine, puisqu'elle se produit encore après dilution au 1/500.000. Sa solubilité dans l'alcool à 98°-99° est relativement faible, 1 partie dans 24 parties d'alcool bouillant.

Elle est insoluble ou très peu soluble dans l'alcool et l'éther. Elle est au contraire assez soluble dans l'acide acétique, l'acétate d'éthyle. Parmi les sels métalliques on ne connaît guère que le sous-acétate basique de plomb qui la précipite de ses solutions. Elle ne réduit pas la liqueur de Fehling.

Sa réaction la plus caractéristique a été indiquée par Sonnenschein : on prélève, à l'extrémité d'un fil de platine suffisamment élargi, quelques cristaux d'esculine, on les plonge dans l'acide azotique concentré et aussitôt après dans l'ammoniaque pure ; le glucoside prend une coloration rouge sang très intense. Si cette réaction est moins sensible que la fluorescence, elle a l'avantage de pouvoir se prêter à des recherches microchimiques. Elle se produit encore avec une quantité de substance très faible et constitue une méthode sûre dans la recherche de l'esculine dans les tissus végétaux.

COMPOSITION. — CONSTITUTION. — DÉDOUBLEMENT

La composition de l'esculine a été très discutée, et nombreuses sont les formules qui furent proposées pour représenter ce corps. Tromsdorf adopta la notation $C^{16}H^{9}O^{10}$, Delffes $C^{22}H^{14}O^{14}$, Zwenger $C^{76}H^{41}O^{47}$, Rocheleder et Scharz $C^{62}H^{24}O^{26}$. Par la suite, revenant sur cette formule Rocheleder proposa pour l'esculine desséchée à 115° la composition $C^{60}H^{34}O^{38}$. Actuellement la formule adoptée est celle indiquée par Schiff $C^{15}H^{16}O^{9}$, $2H^{2}O$ ou celle de

Digitized by Google

LIEBERMANN, qui ne diffère de la précédente que par la quantité d'eau de cristallisation $C^{15}H^{16}O^{9}$, $1\ ^1/_3H^2O$.

Les travaux de SCHIFF, LIEBERMANN, KNIETSCH, WIELL et TIEMANN, dans les détails desquels nous n'entrerons pas, ont fixé ses rapports avec la coumarine, l'ombelliforéne, les acides oxycinnamiques, et on la considère comme un glucoside dérivant d'un corps phénolique à fonction lactone.

$$\begin{array}{r} (5)\ OH \diagdown \\ (4)\ C^6H^{11}O^5 - O \diagdown \end{array} C^6H^2 \begin{array}{l} \diagup CH = CH\ (1) \\ \diagdown O - \underset{|}{CO}\ (2) \end{array}$$

Elle est isomère avec la daphnine, glucoside non azoté retiré de l'écorce du *Daphne Mezereum* dans lesquels les fonctions phénoliques occupent des positions différentes :

$$\begin{array}{r} (4)\ OH \diagdown \\ (3)\ C^6H^{11}O^5 - O \diagdown \end{array} C^6H^2 \begin{array}{l} \diagup CH = CH\ (1) \\ \diagdown O - \underset{|}{CO}\ (2) \end{array}$$

L'esculine se décompose au-dessus de son point de fusion, et le produit renferme alors de l'esculétine et des produits de décomposition du glucose.

Sous l'action des acides étendus, elle se dédouble en glucose et esculétine :

$$C^{15}H^{16}O^{9} + H^2O = C^6H^{12}O^6 + C^9H^6O^4.$$

L'émulsine à la température de 30 à 35° agit sur l'esculine et la dédouble en donnant également du glucose et de l'esculétine.

L'esculétine est donc le produit d'hydrolisation de l'esculine. ROCHELEDER prétend qu'elle se trouve en petite quantité dans l'écorce du marronnier, mais il est bien difficile de savoir si ce produit ne provient pas de l'action des réactifs sur l'esculine pendant le traitement de l'écorce.

Ce sont de petites aiguilles, brillantes, incolores, soyeuses, renfermant de l'eau de cristallisation qu'elles perdent à 100°. Elle est peu soluble dans l'eau froide, un peu plus dans l'eau chaude en donnant une solution de fluorescence bleu pâle. Elle est soluble dans l'alcool bouillant, insoluble dans l'éther. Elle fond vers 270°, brunit et se détruit en grande partie à cette température.

Elle réduit très difficilement la liqueur de FEHLING.

Digitized by Google

L'esculétine chauffée avec de l'eau de baryte fixe une molécule d'eau et donne l'acide trioxycinnamique (1, 2, 4, 5) : c'est une dioxycoumarine 4, 5

$$\begin{matrix}(5)\,OH \\ (4)\,OH\end{matrix} > C^6H^2 < \begin{matrix} CH = CH\ (1) \\ | \\ O - CO\ (2)\end{matrix}$$

tandis que son isomère, la daphnétine, dérivant de l'hydrolisation de daphnine, est une dioxycoumarine 3, 4

$$\begin{matrix}(4)\,OH \\ (3)\,OH\end{matrix} > C^6H^2 < \begin{matrix} CH = CH\ (1) \\ | \\ O - CO\ (2)\end{matrix}$$

On voit aussi ses rapports avec l'acide ombellique ou acide dioxycinnamique 1, 2, 4

$$\begin{matrix}(4)\,OH \\ (2)\,OH\end{matrix} > C^6H^3 - CH = CH - COOH\ (1)$$

et l'ombelliférone ou oxycoumarine.

$$(4)\,OH - C^6H^3 < \begin{matrix} CH = CH\ (1) \\ | \\ O - CO\ (2)\end{matrix}$$

L'acide caféique dont nous aurons à parler plus tard appartient aussi à ce groupe ; c'est acide dioxycinnamique 1, 3, 4 ; mais il ne donne pas de lactone, les groupements acides et phénoliques ne se trouvant pas en position 1, 5 comme dans le cas de l'acide ombellique.

Il était indispensable, pour la suite de cette étude, de montrer la constitution de l'esculine et des corps dont il est rationnel de la rapprocher. Le tableau suivant résume la question.

Digitized by Google

$C^6H^5-CH=CH-COOH$ (1)

Acide cinnamique

C^6H^4 ⟨ $CH=CH-COOH$(1) ; OH (2)

Acide coumarique
(oxycinnamique)

C^6H^4 ⟨ $CH=CH$; $O-CO$

Coumarine

C^6H^3 ⟨ $CH=CH-COOH$ (1) ; OH (2) ; OH (4)

Acide ombellique
(dioxycinnamique 1. 2. 4.)

C^6H^3 ⟨ $CH=CH$; $O-CO$; OH (4)

Ombelliférone
(oxycoumarine

C^6H^3 ⟨ $CH=CH-COOH$ (1) ; OH (3) ; OH (4)

Acide caféique
(dioxycinnamique 1. 3. 4.)

C^6H^3 ⟨ $CH=CH-COOH$ (1) ; OH (2) ; OH (3) ; OH (4)

Acide
trioxycinnamique 1.2.3.4.

C^6H^2 ⟨ $CH=CH$; $O-CO$; OH (3) ; OH (4)

Daphnétine
(dioxycoumarine 3. 4.)

C^6H^2 ⟨ $CH=CH$; $O-CO$; $O\,C^6H^{11}O^5$ (3) ; OH (4)

Daphnine

C^6H^2 ⟨ $CH=CH-COOH$; OH (2) ; OH (4) ; OH (5)

Acide Esculétinique
(trioxycinnamique 1.2.4.5.)

C^6H^2 ⟨ $CH=CH$; $O-CO$; OH (4) ; OH (5)

Esculétine
(dioxycoumarine 4. 5.)

C^6H^2 ⟨ $CH=CH$; $O-CO$; $O\,C^6H^{11}O^5$; OH (4)

Esculine

Digitized by Google

LOCALISATION DE L'ESCULI

Parmi les différentes réactions qui sont susceptibles d'être utilisées pour la localisation de l'esculine dans la plante, on doit citer :

1° La réaction de l'acétate basique de plomb ;

2° La réaction de la liqueur de Fehling après dédoublement de l'esculine par l'acide chlorhydrique ou l'émulsine ;

3° La réaction de Sonnenschein.

Pour étudier la marche de ces diverses réactions et se familiariser avec elles, on prend ou les jeunes jets qui, au printemps, s'échappent du tronc et des grosses branches du marronnier, ou, mieux encore, si c'est possible, des germinations ou de jeunes plantes poussées à l'abri de la lumière. Dans ces conditions la coloration de la chlorophylle ne viendra gêner en rien la netteté de la réaction.

L'échantillon une fois prélevé sera transporté au laboratoire et aussitôt soumis aux différents traitements.

1° Action de l'acétate basique de plomb.

C'est un réactif bien médiocre dans ce cas et qui ne peut nous donner que des résultats incertains, car il précipite l'acide esculitannique et les différentes matières protéiques qui se trouvent dans le marronnier. Les coupes sont plongées dans la solution d'acétate basique de plomb (extrait de Saturne), et on les y abandonne de 10 à 15 minutes. Elles sont retirées au bout de ce temps et lavées à l'eau distillée, récemment bouillie, afin de la priver de son acide carbonique. C'est une précaution nécessaire, car sans elle on obtiendrait dans toutes les cellules un précipité granuleux d'hydrocarbonate de plomb qui obscurcirait toute la préparation.

Après plusieurs lavages successifs, la coupe est montée en glycérine neutre; dans toutes les cellules qui renferment de l'esculine on

Digitized by Google

constate dès lors un précipité blanc, abondant, bien limité, remplissant complètement la cellule et tranchant sur le reste de la préparation par son opacité.

Nous avons essayé de mettre plus facilement en évidence cette localisation par une double décomposition entre le précipité plombique et l'iodure de potassium ou le chromate de potasse. Nous employons pour cela une solution d'iodure de potassium au 1/10. Une dilution plus grande n'est pas utile, car avec des solutions au 1/100 ou même au 1/25, la double décomposition se fait très mal. La coupe après plusieurs lavages à l'eau distillée, privée d'acide carbonique, est plongée dans la solution d'iodure de potassium pendant une minute. La réaction est instantanée, la préparation devient complètement jaune, et les cellules à esculine se différencient facilement des autres.

Si l'on se sert de chromate de potasse, on opérera de la même façon avec une solution à 5 p. 100, titre qui convient le mieux.

La facilité avec laquelle on peut effectuer ces manipulations semblerait leur faire accorder la priorité; nous préférons toutefois, nous servir de sulfhydrate d'ammoniaque, et cela malgré les inconvénients que présente l'emploi de ce réactif, car les réactions avec l'iodure de potassium et le chromate de potasse telles que je les ai décrites ne sont pas toujours uniformes, et c'est là un grand inconvénient en histochimie.

Il est donc préférable d'employer des solutions très diluées de sulfhydrate d'ammoniaque aux titres suivants: une goutte de réactif dans 2, 5, 10 et 25 centimètres cubes d'eau distillée.

De ces quatre réactifs les deux premiers donnent un précipité trop noir dans toute la préparation; le dernier, au contraire, trop faible dans les cellules à esculine de la moelle et de la région endodermique. En employant la solution renfermant une goutte de réactif pour 10 centimètres cubes d'eau, on obtient en général une très belle localisation, la coupe prend une teinte marron, tandis que toutes les cellules où s'était formé un précipité plombique passent au noir plus ou moins intense.

Digitized by Google

2° Essai de localisation de l'esculine par l'emploi de la liqueur de Fehling.

L'esculine ne réduit pas la liqueur de Fehling ; mais, si l'on fait agir l'acide chlorhydrique ou l'émulsine sur ce glucoside, on obtient une réduction rapide produite par le glucose mis en liberté. Il était naturel de penser qu'en faisant cette réaction sur les coupes nous obtiendrions un précipité d'oxydule de cuivre dans les cellules à esculine.

Il faut tenir compte cependant que dans le marronnier il existe un corps capable, lui aussi, de réduire assez rapidement la liqueur de Fehling, c'est l'acide esculitannique.

Dès lors, en faisant agir la liqueur cupro-potassique sur une coupe, après quelques instants d'ébullition, la réduction immédiate décèlera l'acide esculitannique. Si nous répétons la même expérience sur une coupe identique, après l'action de l'acide chlorhydrique dilué, nous devrions obtenir une nouvelle localisation, qui, par comparaison avec la première, indiquerait le lieu d'élection de l'esculine. Il n'en est pas tout à fait ainsi, comme nous allons le voir.

Pratiquement, il est extrêmement difficile de se servir de la liqueur de Fehling, car le précipité d'oxydule de cuivre étant très long à se former, la coupe est d'ordinaire altérée avant la fin de la réaction. En étendant de son poids d'eau la liqueur cupropotassique, on diminue un peu cet inconvénient et après trois ou quatre minutes d'ébullition on obtient un précipité rosé dans certaines cellules. La réaction est peu précise, et en outre tous les éléments sont déformés, la liqueur est encore trop fortement alcaline, et les coupes ne peuvent résister à une ébullition prolongée dans ce milieu.

Pour tourner cette difficulté, nous nous sommes servi d'une liqueur cuivrique où la potasse est remplacée par le carbonate de potasse. Pour cela on peut employer la poudre connue sous le nom de poudre d'Ost et qui renferme :

Digitized by Google

Carbonate de potasse.	250	grammes
Bicarbonate de potasse.	100	—
Sulfate de cuivre	25	—

On en dissout 30 grammes dans une quantité d'eau suffisante pour faire 90 centimètres cubes. La viscosité de cette solution est telle qu'une goutte déposée sur la lame porte-objet ne s'étale que difficilement et forme un ménisque convexe très accentué.

On dispose environ un demi à 1 centimètre cube de la liqueur d'Ost dans la cellule d'une lame que nous avons fait construire spécialement pour l'étude des localisations. Cette lame est portée à température élevée, sur une plaque chauffante. Dès que la solution est en ébullition, on y plonge les coupes préparées au moment du besoin et on laisse bouillir quelques instants. L'eau s'évaporant sans cesse, les coupes ne tardent pas à baigner dans une véritable bouillie de carbonate de potasse et de sulfate de cuivre. Il faut surveiller très attentivement l'opération de façon à ne pas laisser évaporer à siccité. C'est un inconvénient que l'on évite en ajoutant de temps en temps, au moyen d'une pipette effilée, quelques gouttes de liqueur. Cette ébullition en milieu excessivement concentré est favorable à une bonne localisation, la substance à mettre en évidence ne pouvant probablement diffuser que très lentement. En tout cas, on obtient ainsi un précipité franchement localisé dans la cellule. On peut même remarquer qu'en se servant de cette lame, qui permet l'usage d'une très petite quantité de liquide, on obtient une localisation bien plus nette que si l'on opère avec la même liqueur d'Ost employée en grande quantité, comme dans un verre de montre ou un tube à essai. Il semble que l'évaporation rapide de la petite quantité de liquide placée sur la lame amène une concentration favorable à une bonne localisation.

Toutefois, si l'on n'a pas cette lame à sa disposition, on peut arriver aussi à un bon résultat en augmentant la densité de la solution. Pour cela on fait une liqueur d'Ost excessivement concentrée en mettant dans un verre de montre 5 grammes de poudre et 3 à 4 centimètres cubes d'eau. L'opération est conduite comme précédemment.

La réaction supposée terminée, les coupes sont immédiatement

Digitized by Google

lavées à l'eau, pour enlever la bouillie cuprique qui y adhère, et montées dans la glycérine.

En opérant ainsi nous avons pu obtenir un précipité rouge d'oxydule de cuivre dans toutes les cellules renfermant de l'acide esculitannique.

Disons de suite que ces éléments se rencontrent surtout dans la région épidermique, l'endoderme, la périphérie de la moelle et en petite quantité dans tous les parenchymes.

Cette première action de la liqueur de Fehling fixe ainsi la localisation de l'acide esculitannique et, par suite, permet d'établir une comparaison avec d'autres localisations. La liqueur cupro-potassique, réagissant à nouveau après dédoublement de l'esculine, devrait en effet montrer une nouvelle répartition du précipité d'oxyde de cuivre, et indiquer par un examen différentiel le siège du glucoside. Nous allons voir que si l'on peut facilement obtenir la réduction de la liqueur de Fehling par l'acide esculitannique, il n'en est pas tout à fait de même pour la recherche de l'esculine.

Le dédoublement de glucoside dans les coupes se fait au moyen de l'émulsine ou de l'acide chlorhydrique dilué à 1 p. 100.

Après une ou deux secondes d'ébullition dans la solution acide, les coupes portées dans la liqueur d'Ost bouillante ne donnent plus de précipité d'oxydule de cuivre. Ce résultat inattendu peut s'expliquer par ce fait que la trop grande quantité de liquide dissout les produits de dédoublement. L'expérience est répétée, en déposant quelques coupes dans un verre de montre avec une goutte de solution chlorhydrique. On chauffe rapidement et on retire les préparations de seconde en seconde pour les plonger aussitôt dans la liqueur d'Ost bouillante.

Il ne se forme jamais de précipité d'oxydule de cuivre, sauf dans quelques cellules épidermiques des préparations retirées les premières. De nouvelles coupes traitées identiquement ne donnent plus de réaction avec le bichromate de potasse, ni de coloration par la réaction de Sonnenschein. On peut en conclure que l'acide esculitannique et l'esculine ont disparu par dissolution dans le liquide employé.

La recherche de l'esculine après l'action de l'émulsine peut se faire de la façon suivante : les coupes placées dans une goutte

Digitized by Google

d'eau additionnée de 3 à 4 centigrammes d'émulsine, des amandes sont abandonnées à la température du laboratoire (18 à 20°), puis, au bout d'une demi-heure, traitées par la liqueur d'Ost. La précipitation est identique à ce que l'on obtient avant l'action de l'émulsine. Afin de s'assurer que l'émulsine avait pu agir pour dédoubler le glucoside, nous avons refait l'expérience suivante : Dans une boîte de Pétri renfermant quelques gouttes d'eau tenant en suspension une assez grande quantité d'émulsine, on dépose des coupes du pétiole d'*Æsculus Hippocastanum*.

Il faut que la quantité d'eau soit juste suffisante pour humecter les coupes, et assez faible pour les empêcher de se déplacer dans le liquide. Comme expérience témoin, on dispose dans un tube 0 gr. 30 d'esculine et 0 gr. 05 d'émulsine. Le tout est placé dans une étuve à 35° pendant deux heures. Au bout de ce temps, le tube témoin donne une réaction rapide de la liqueur de Fehling ; les coupes, après une ébullition prolongée dans la liqueur d'Ost, donnent un précipité d'oxydule de cuivre dans les mêmes cellules que précédemment.

On peut envisager les résultats de cette expérience de deux manières : ou l'acide esculitannique et l'esculine sont dans des cellules différentes, mais l'esculine s'y trouve sous une forme telle que l'émulsine ne peut en effectuer le dédoublement ; ou l'acide esculitannique et l'esculine se trouvent dans les mêmes cellules, et c'est ce qui explique que nous obtenons la même localisation dans les deux cas.

3° Localisation de l'esculine par la réaction de Sonnenschein.

La réaction qui permet le mieux la localisation de l'esculine est la réaction de Sonnenschein. Elle consiste à plonger les coupes dans l'acide azotique concentré, puis à les retirer aussitôt pour les mettre dans l'ammoniaque pure. On obtient ainsi une localisation nette et précise, et la technique en est relativement facile en suivant exactement les indications que nous allons donner. C'est un hasard qui nous a permis de fixer exactement les conditions

Digitized by Google

de cette réaction. Dans les premiers essais, en employant une aiguille en fer pour plonger les coupes dans l'acide azotique et l'ammoniaque, nous obtenions une coloration rouge magnifique dans les cellules à esculine. Le lendemain, reprenant ces expériences avec une aiguille en bois, nous constations que la réaction ne se produisait plus. En reprenant une aiguille en fer la teinte rouge apparaissait, mais seulement aux endroits des coupes touchées par le métal.

Il est facile de conclure que la réaction pour apparaître franchement nécessite l'emploi d'acide azotique chargé de vapeurs nitreuses ou contenant du fer.

La proportion de fer que doit renfermer l'acide n'est pas indéterminée, les meilleurs résultats s'obtiennent avec le réactif suivant, dont nous avons fixé les conditions d'action. On prend 300 grammes d'acide azotique pur marquant 1,33 au densimètre ; on fait, d'autre part, dissoudre 1 gramme de fil de clavecin dans 20 centimètres cubes d'eau acidulée par l'acide azotique. On ajoute par petites portions 2 centimètres cubes de cette solution dans l'acide pur et après chaque addition on essaie la réaction sur une coupe provenant d'un jeune rameau poussé à l'obscurité. Les résultats que nous avons obtenus par cette méthode sont consignés dans le tableau suivant :

Digitized by Google

	QUANTITÉS de solution de Fe.	DURÉE du contact avec AzO^3H	RÉSULTATS
300 grammes d'acide azotique à 1,33 additionnés de :	2cmc. 0,10 de Fe.	3 secondes	Coloration rose chair dans quelques cellules.
		8 secondes	id.
	4cmc. 0,20 de Fe.	3 secondes	Coloration rose dans les cellules endodermiques et médullaires
		8 secondes	id.
	6cmc. 0,30 de Fe.	3 secondes	Coloration rouge faible ; la localisation s'accuse assez franchement.
		8 secondes	id.
	8cmc. 0,40 de Fe.	3 secondes	Les cellules à esculine ne sont pas encore fortement colorées en rouge violacé.
		8 secondes	id.
	10cmc. 0,50 de Fe.	3 secondes	Coloration, on n'obtient pas encore la teinte violacée caractéristique.
		8 secondes	id.
	12cmc. 0,60 de Fe.	3 secondes	id.
		8 secondes*	id.
	14cmc. 0,70 de Fe.	3 secondes	Localisation très nette. Coloration rouge violacée.
	16cmc. 0,80 de Fe.	3 secondes	id.
	18cmc. 0,90 de Fe.	3 secondes	id.
	20cmc. 1 gr. de Fe.	3 secondes	id.

* Cette formule est à notre avis la meilleure : par son emploi, toutes les cellules à glucosides deviennent franchement rouge violacé.

Digitized by Google

La question du temps de contact avec l'acide joue aussi un très grand rôle ; le tableau suivant résume les résultats obtenus dans ces expériences en employant un acide renfermant 0,20 de fer pour 100 grammes :

TABLEAU II

1″ Coloration rose, en général à peine accusée ;
2″ id. teintée légèrement de violet ;
3″ id. rouge violacé ;
4″ id. id.
5″ id. id.
6″ id. id. Un précipité d'hydrate d'oxyde de fer qui masque la réaction commence à apparaître ;
7″ Coloration rouge violacé. Précipité d'oxyde de fer ;
8″ id. id. id.
9″ id. id. Le précipité d'oxyde de fer masque toute la préparation ;
10″ Réaction de moins en moins nette. Quelques rares cellules sont encore colorées en rouge violacé ;
15″ Abondant précipité d'oxyde de fer. Les cellules à esculine ne se colorent plus.
20″ Abondant précipité d'oxyde de fer. Les cellules à esculine ne se colorent plus.

En résumé, pour caractériser l'esculine dans les cellules qui la contiennent, le réactif de Sonnenschein seul donne d'excellents résultats. Le meilleur mode opératoire consiste à plonger les coupes pendant 2 à 4 secondes dans de l'acide azotique à 1,33 renfermant 0,20 à 0,30 de fer pour 100, puis à les retirer vivement pour les faire baigner immédiatement dans de l'ammoniaque liquide du commerce. Le séjour dans ce dernier réactif peut durer quelques minutes.

On monte alors la préparation dans la glycérine.

Pratiquement, on est averti de la bonne marche de la réaction par le fait suivant : après immersion de la coupe dans l'acide azotique, lorsqu'on la plonge dans l'ammoniaque, elle reste 1 à 2 secondes environ sans changer de coloration, puis d'un seul coup vire au rose et au rouge violacé. En surveillant ce phénomène, on peut en tirer une indication sur la conduite à tenir ou sur le résultat de la réaction.

Digitized by Google

CHAPITRE II

LOCALISATION SPÉCIALE DE L'ESCULINE DANS LES TISSUS DES DIFFÉRENTS ORGANES DE L'ÆSCULUS HIPPOCASTANUM

I. — Organes végétatifs.

Tige. — La structure histologique d'une tige de l'année est la suivante :

L'épiderme pourvu d'une cuticule peu développée possède quelques poils coniques unicellulaires très rares, qui y sont enfoncés. Viennent ensuite quatre à cinq rangées de cellules collenchymateuses sous-épidermiques et un parenchyme cortical assez réduit dont quelques cellules renferment des mâcles d'oxalate de calcium.

Le cylindre central comprend un cercle complet de faisceaux libéro-ligneux de forme ovale séparés par de larges rayons médullaires qui se lignifient en vieillissant. Chaque faisceau est coiffé d'un arc de 4 à 5 assises de fibres péricycliques. Le liber présente des îlots de tubes criblés avec leurs cellules annexes, le plus souvent isolés et séparés les uns des autres par de larges cellules du parenchyme libérien ; il renferme quelques cristaux rhomboédriques d'oxalate de chaux au voisinage du péricycle.

Le bois est fortement vasculaire, et le parenchyme ligneux très peu ou pas lignifié. La moelle est très développée, formée d'éléments plus petits et peu lignifiés à la périphérie, grands et parenchymateux au centre avec quelques mâcles.

Une coupe de tige traitée comme nous l'avons indiqué au chapitre précédent montre la répartition suivante pour les cellules à esculine :

Digitized by Google

Toutes les cellules de l'épiderme et de la première assise sous-épidermique se colorent en rouge vif; il en est de même pour quelques éléments de la troisième et quatrième assise sous-jacente. Au-dessous de ce collenchyme sous-épidermique qui renferme la plus grande partie de l'esculine, se trouve le parenchyme chlorophyllien, dont la couleur verte tranche sur le reste de la préparation. Il n'y a que très peu de cellules à esculine dans ce parenchyme chlorophyllien. La formation de ce glucoside ne paraît donc pas être le résultat immédiat de la fonction assimilatrice. Dans le parenchyme cortical, quelques cellules donnent la réaction ; elles sont situées un peu çà et là, sans ordre apparent. *Quant à l'endoderme, la coloration caractéristique y apparaît nettement ;* mais il convient de remarquer que certains éléments cellulaires, riches en amidon, restent insensibles à l'action du réactif (Pl. V et VI).

Dans le liber on compte généralement cinq ou six cellules colorées par arc libérien ; la réaction est plus apparente surtout dans les grandes cellules de parenchyme qui entourent les plages de tubes criblés et principalement celles qui sont immédiatement situées au-dessous du péricycle. Ni les tubes criblés, ni les cellules annexes ne se colorent. Dans le bois on ne trouve guère d'esculine que dans certaines cellules du parenchyme ligneux voisines des éléments primaires du faisceau, et, *à la périphérie de la moelle, le réactif colore presque toutes les cellules en contact avec les éléments ligneux.*

Cette localisation donne *l'apparence d'une ligne sinueuse de cellules bordant intérieurement le cylindre central comme l'endoderme le limite vers l'extérieur.* Dans la moelle, les cellules à esculine sont disposées sans ordre apparent (Pl. V et VI).

La structure d'une tige de deux ans est un peu différente.

A l'extérieur un suber de 7 à 8 assises ; puis un parenchyme cortical assez développé, à cellules petites et arrondies, collenchymateuses vers les parties les plus externes, et devenant plus grandes à mesure qu'elles se rapprochent du cylindre central. Plusieurs de ces cellules contiennent des groupements mâclés d'oxalate de chaux en nombre toutefois restreint. Le péricycle est représenté par des arcs de tissu mécanique formé de fibres arrondies à lumen très étroit qui recouvrent chaque faisceau et finissent par se rejoindre latéralement pour constituer un anneau fibreux complet. Le cylin-

Digitized by Google

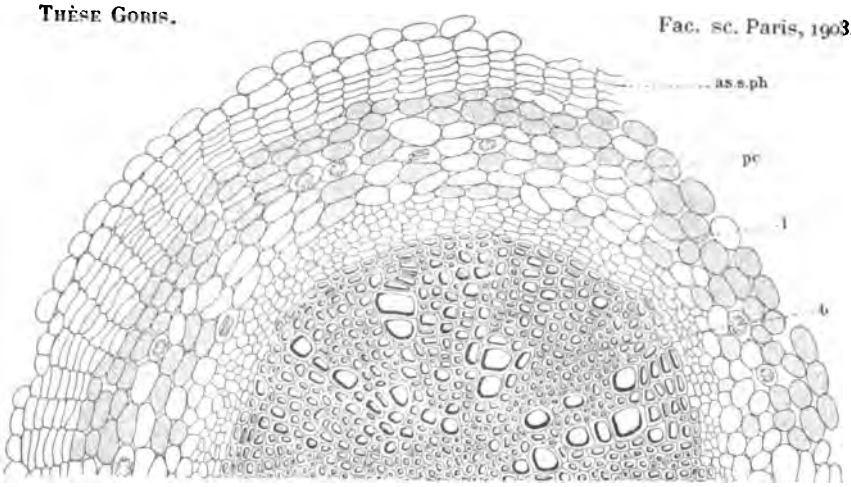
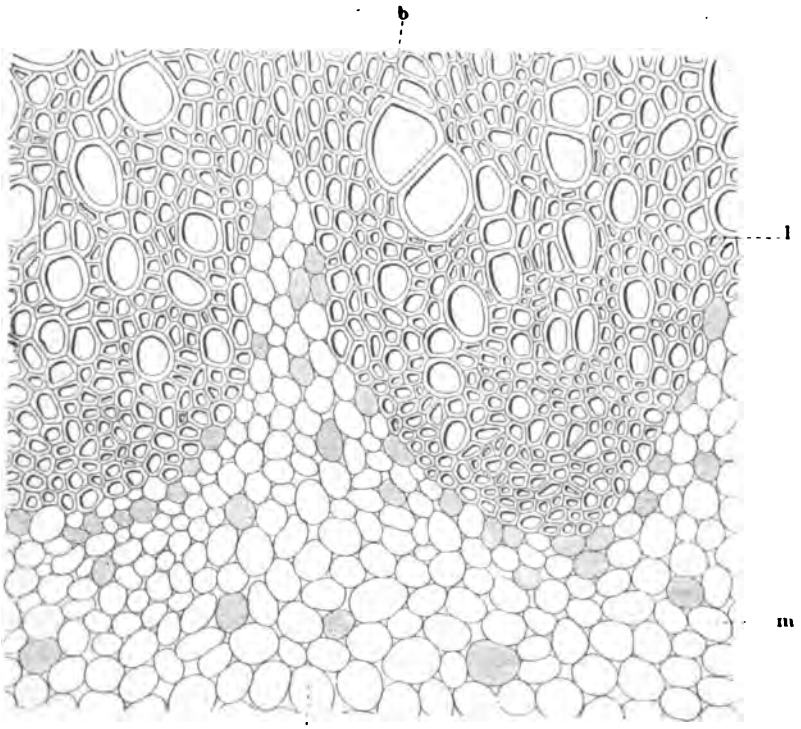


FIG. 1



A. GORIS Del. m FIG. 2. BONARD. Sc.

Pl. I. — FIG. 1. — Répartition de l'esculine dans une jeune racine d'*Æsculus Hippostanum* L..

as. s. ph, assise subéro-phellodermique ; *pc*, parenchyme cortical ; — *l*, liber ; *b*, bois.

FIG. 2. — Répartition de l'esculine à la périphérie de la moelle d'un faisceau de l'*Æsculus Hippocastanum* L.

b, bois ; — *l*., liber ; — *m*, moelle.

Digitized by Google

Digitized by Google

dre central est peu différent de celui de la tige d'un an. Le bois dans lequel on distingue aisément les zones annuelles d'accroissement est simplement un peu plus lignifié.

Dans cet organe, l'esculine se localise dans le phelloderme, le parenchyme cortical, l'endoderme, le liber, les rayons médullaires, la moelle et la zone périmédullaire; en un mot, dans tous les parenchymes, avec cette particularité que le plus grand nombre de cellules à esculine se trouve dans le phelloderme, l'endoderme, la périphérie de la moelle (Pl. I, fig. 2). Le liège ne renferme pas de glucoside.

Aucune modification importante n'existe dans la structure intime plus âgée. Le périderme est beaucoup plus développé, les cellules du parenchyme cortical sont aplaties, allongées tangentiellement. Les cristaux d'oxalate de calcium s'y trouvent en bien plus grand nombre et disposés dans des cellules voisines, formant ainsi des amas disposés parallèlement au-dessus du péricycle fibreux et continu.

Le liber est disposé en files radiales, séparé par des rayons médullaires très petits à une seule assise de cellules, traversant toute la région libérienne pour aboutir au péricycle. Des éléments nouveaux apparaissent dans cet organe; ce sont des rangées de fibres libériennes disposées en traînées transversales et parallèles.

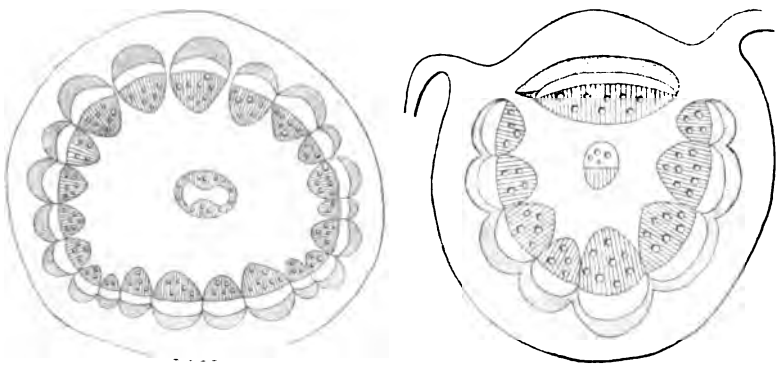
L'esculine se trouve localisée aux endroits suivants : 1° dans les trois ou quatre premières assises du phelloderme, qui se colorent par la réaction de Sonnenschein ; 2° dans le parenchyme cortical, qui, contrairement à ce que nous avons dit pour la tige jeune, est assez riche en esculine.

La plus grande proportion se trouve au voisinage du péricycle, mais l'endoderme ne se différencie pas nettement comme dans la tige jeune. Au-dessous, dans la zone libérienne, on trouve encore des cellules à esculine mais bien moins nombreuses. Quelques amas de cellules, colorées en rouge, se rencontrent immédiatement au-dessous du péricycle; dans le liber jeune on ne trouve de l'esculine que dans les rayons médullaires. Le liège, les cellules oxalifères, les fibres et les cellules scléreuses ne donnent pas de réaction.

Des recherches analogues faites sur des arbres âgés et sur une écorce d'environ 12 millimètres d'épaisseur, prélevée par nos soins et attirée immédiatement par les réactifs, ont permis de constater

Digitized by Google

une répartition analogue des cellules à glucoside. Signalons cependant la richesse en esculine de l'écorce secondaire (phelloderme). Quand une nouvelle assise phellogène prend naissance plus profondément, ce nouveau périderme exfolie l'ancien avec le glucoside qu'il renferme en abondance. Ce fait est intéressant à constater. Ainsi donc, l'esculine comme l'oxalate de chaux, après s'être accu-



Pétiole. Nervure médiane.

Fig. 1.

Schéma de la structure anatomique du pétiole et de la nervure médiane de l'*Æsculus Hippocastanum* L.

mulée principalement vers la couche externe de l'écorce, est rejetée avec le rhytidome (Pl. VII).

Faut-il en conclure que ce produit est une excrétion ou, tout au moins, un résidu de l'activité cellulaire, un produit de désassimilation inutile aux besoins du végétal? Tout semble le prouver, car au moins pour la plus grande partie, dans les arbres âgés, le glucoside se trouve éliminé avec les rhytidomes successifs.

Si l'on ajoute qu'on n'en rencontre qu'une très petite quantité dans les divers autres tissus très jeunes, il faut reconnaître que cette hypothèse est plausible.

Pétiole. — La structure du pétiole est identique à celle de la tige de première année. La seule différence importante consiste en ce

Digitized by Google

que, au milieu de la moelle, on trouve généralement 2, parfois 3 faisceaux concentriques à liber intérieur (fig. 1). Ces faisceaux ont, d'ailleurs, été étudiés par M. H. Bouygues (1) et décrits sous le nom de pseudo-faisceaux concentriques inverses.

Dans le faisceau médullaire, quelques cellules de l'endoderme et du parenchyme libérien prennent la coloration rouge (Pl. VIII.)

La localisation de l'esculine dans le pétiole offre donc la même répartition que dans la tige; il faut remarquer cependant que l'épiderme, l'endoderme et la périphérie de la moelle sont les lieux de prédilection du glucoside.

Feuille. — Les cellules de l'épiderme supérieur de la feuille sont rectangulaires en coupe transversale et de dimensions variables. La cuticule est peu développée et striée; les cellules de l'épiderme inférieur, également rectangulaires, sont de dimensions moitié moindres que celles des cellules épidermiques supérieures. La feuille âgée est glabre. Les jeunes feuilles ont de longs poils coniques, unicellulaires, enfoncés dans l'épiderme, et munis de petites pointes à leur surface.

Le mésophyle bifacial comprend une assise palissadique, qui occupe à peu près un tiers de l'épaisseur totale. Le reste est formé de parenchyme lacuneux, où l'on rencontre quelques rares cellules à essence analogues à celles des Laurinées.

Les stomates, entourés par 4 ou 5 cellules annexes, ne présentent rien de régulier dans leur disposition. La nervure médiane est biconvexe, fortement proéminente à la face inférieure. Sous chaque épiderme on remarque un tissu collenchymateux développé, surtout sous l'épiderme supérieur.

Le système libéro-ligneux est formé de deux faisceaux. L'un, disposé en arc, et l'autre, au contraire, à section rectiligne réunissant les deux extrémités du premier. L'endoderme entoure toute la stèle, et le péricycle est entièrement fibreux.

Dans la moelle on trouve un faisceau médullaire à liber intérieur. Dans le mésophylle de la feuille et le parenchyme de la nervure se

(1) H. Bouygues. *Structure, origine et développement de certaines formee vasculaires anormales du pétiole de Dicotylédones*, p. 4-8, 103-105, Bordeaux, 1902.

Digitized by Google

trouvent quelques rares cristaux mâclés d'oxalate de chaux. Dans le limbe, l'esculine se trouve localisée dans les deux épidermes, mais la réaction est beaucoup plus accentuée dans l'épiderme supérieur. Il en existe de petites quantités dans le parenchyme palissadique, et, dans le parenchyme lacuneux, quelques cellules se colorent après l'action du réactif de Sonnenschein; mais leur nombre est relativement faible (Pl. X, fig. 4). La localisation dans la feuille est assez délicate à effectuer, car souvent la coloration rouge qui provient des cellules épidermiques supérieures diffuse et rend l'examen difficile. Toutefois, avec un peu d'habileté, on peut arriver à une localisation très nette, et nous pouvons affirmer que l'esculine ne se trouve qu'en très petite quantité dans les cellules palissadiques.

Dans le mésophylle, le glucoside se rencontre surtout dans l'épiderme, et les assises collenchymateuses sous-jacentes et, en particulier, dans les collenchymes de la face supérieure. Le parenchyme de la nervure est encore moins riche en cellules à esculine que le parenchyme cortical de la tige. Ces cellules se rencontrent aussi dans les parenchymes libériens et ligneux, les rayons médullaires, mais c'est dans l'endoderme et la zone péridermique qu'on en trouve le plus grand nombre.

Le contenu des poils tecteurs paraît renfermer de l'esculine, bien que, d'ordinaire, ils ne prennent pas la coloration. Il faut tenir compte de la nature de leur membrane, qui s'oppose à la diffusion du réactif, mais tout poil brisé ou endommagé se colore en rouge, le réactif se trouvant ainsi par accident mis directement en contact avec le contenu.

Racine. — En coupe transversale, la radicelle montre la structure suivante : une assise pilifère avec poils radicaux nombreux, puis l'assise subéreuse et un parenchyme cortical assez développé sans cristaux. L'endoderme est très caractéristique, et quelques cellules sont en voie de division pour constituer l'assise subérophellodermique.

Le cylindre central comprend :

Un péricycle non dédoublé, quatre faisceaux de liber disposés au pourtour d'un massif ligneux de forme losangique et complètement lignifié.

Le parenchyme cortical possède très peu de cellules à esculine,

Digitized by Google

et le plus grand nombre se trouve situé au voisinage de l'endoderme. Toutes les cellules endodermiques, sauf celles en voie de division donnent la coloration rouge caractéristique due à la réac-

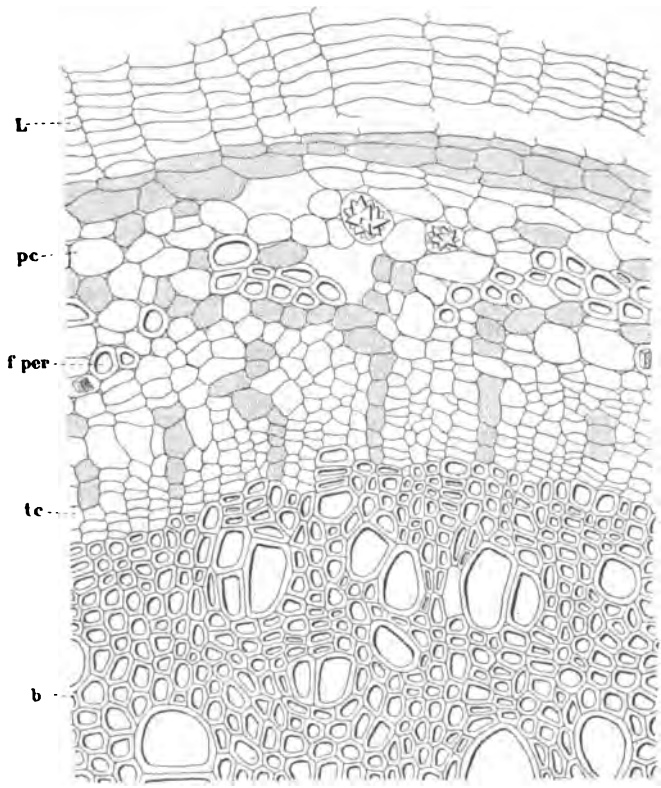


FIG. 2. — Localisation de l'esculine dans une racine d'*Æsculus Hippocastanum* L.

l, liège ; — *pc*, parenchyme cortical ; — *f. per*, fibres péricycliques ; — *tc*, tissu criblé ; — *b*, bois.

tion de SONNENSCHEIN. Le péricycle, contrairement à ce qui existe dans la tige, renferme beaucoup d'esculine. On rencontre encore ce glucoside dans quelques cellules du parenchyme libérien et quelques rares éléments du parenchyme ligneux (Pl. VIII).

Dans une radicelle plus âgée, le liège assez développé a exfolié

Digitized by Google

tout le parenchyme cortical primaire. Le phelloderme est relativement peu développé et renferme de l'oxalate de chaux cristallisé surtout en mâcles, rarement en rhomboèdres. Le bois très développé est fortement ligneux.

L'esculine se trouve répartie en grande quantité dans les cellules du parenchyme cortical secondaire, au voisinage du liège. Elle se localise, en outre, dans le parenchyme; les rayons médullaires du bois renferment aussi quelques rares cellules donnant la réaction caractéristique de ce glucoside (fig. 2).

Dans une racine de 2 à 3 millimètres d'épaisseur, la structure est à peu près identique. La seule différence consiste en la présence de fibres péricycliques et libériennes et d'une plus grande quantité de cristaux d'oxalate de chaux en mâcles et rhomboèdres.

Comme précédemment, l'esculine se trouve dans la partie externe du phelloderme, dans le parenchyme libérien au voisinage des fibres, dans les rayons médullaires libériens, et en très petite quantité dans le parenchyme ligneux.

L'écorce d'une très grosse racine présente une structure presque semblable à celle de l'écorce de la tige. On y rencontre, au-dessous du liège, un parenchyme cortical secondaire et un liber assez développé, avec des amas de fibres péricycliques et libériennes disposées parallèlement. Des cristaux d'oxalate de chaux sont nombreux dans cette écorce âgée (Pl. XI., fig. 2.)

L'esculine se trouve principalement localisée dans le phelloderme et dans le parenchyme cortical et libérien au voisinage des amas fibreux. Le tissu criblé jeune ne renferme pas de cellule à esculine ; on ne trouve ces dernières que dans les rayons médullaires libériens.

II. — **Organes de reproduction.**

Inflorescence. — L'inflorescence du marronnier est une grappe de cymes unipares à fleurs irrégulières. Le calice est gamosépale à 5 lobes imbriqués; il y a 4 pétales non appendiculés; 6 à 8 étamines disposées sur 2 verticilles, dont un est superposé au calice et tou-

Digitized by Google

jours formé de 5 étamines ; l'autre, superposé aux pétales, est incomplet. Le gynécée est composé d'un ovaire à 3 loges biovulées. A la maturité le fruit est une capsule charnue déhiscente renfermant 1 à 3 graines.

La structure de l'axe d'inflorescence se rapproche beaucoup de celle de la tige : l'épiderme à cuticule peu développée possède des

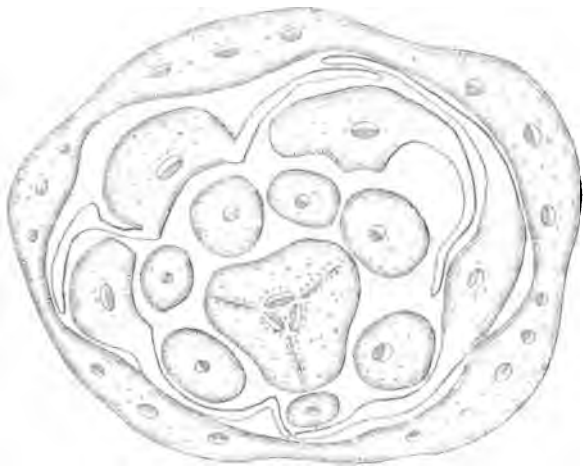


Fig. 3. — Schéma montrant la disposition des pièces dans le bouton floral de l'*Æsculus Hippocastanum* L. (*Le pointillé indique la répartition de l'esculine dans ces organes.*)

poils unicellulaires coniques assez nombreux enfoncés dans l'épiderme.

Les quatre ou cinq assises sous-épidermiques sous-jacentes ne sont pas collenchymateuses, comme dans la tige. Le parenchyme cortical est assez développé et comprend 15 à 20 rangées de cellules. L'endoderme est toujours très visible ; les amas de fibres péricycliques sont disposés au-dessus de chaque faisceau et ne forment pas un anneau fibreux continu comme dans la tige. Le bois fortement vasculaire est très peu lignifié. La moelle est fortement développée.

Les axes de second et troisième degré possèdent une structure à peu près semblable à la précédente. La seule différence consiste en

Digitized by Google

Au bas de l'ovaire très jeune, l'esculine se trouve localisée dans l'épiderme externe et l'assise sous-épidermique, dans le paren-

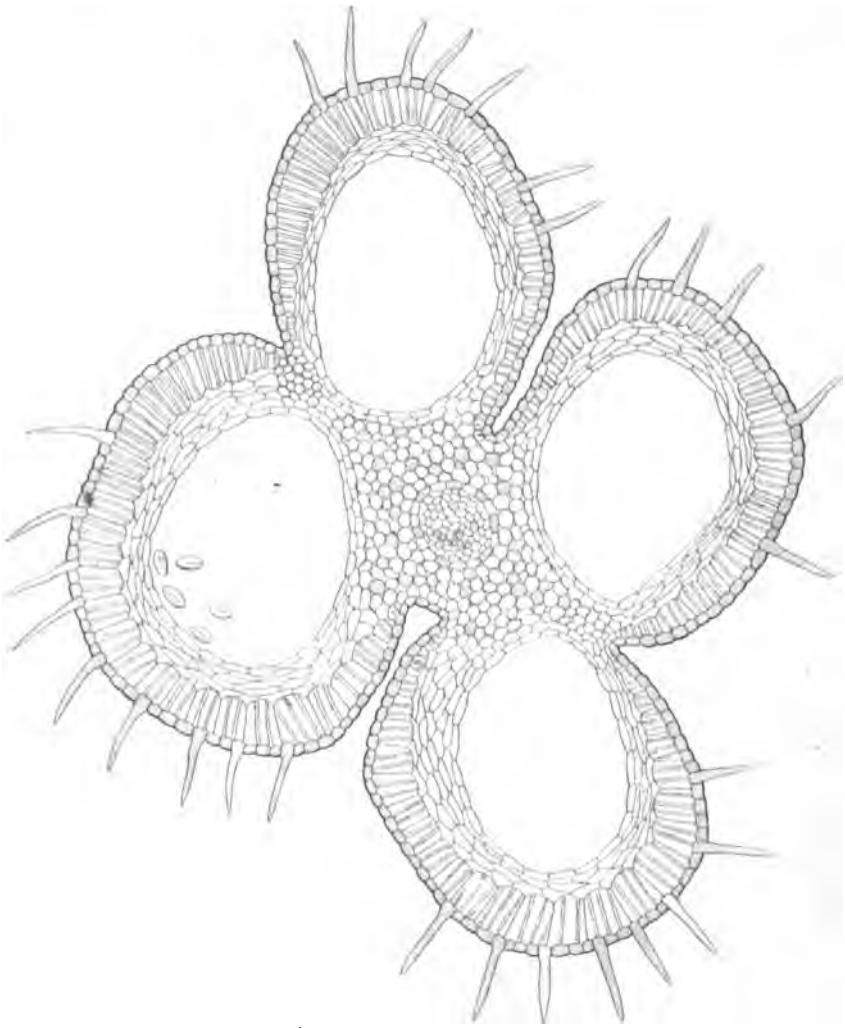


Fig. 4. — Coupe transversale de l'anthère et localisation de l'esculine dans cet organe.

chyme des parois de l'ovaire et en particulier autour des ébauches vasculaires (Pl. II). Dans une coupe faite à une hauteur un peu diffé-

Digitized by Google

rente, nous voyons la réaction devenir intense, suivant trois lignes qui correspondent aux parois ovariennes internes non encore séparées. Lorsque cette séparation est définitive, toutes les cellules épidermiques de la paroi interne donnent la réaction de l'esculine. (Pl. II, fig. 1, 2, 3).

En résumé, dans l'ovaire bien développé, les cellules à glucoside se rencontrent dans les *épidermes externe et interne, et les assises sous-épidermiques dans le parenchyme des parois ovariennes, principalement au voisinage des faisceaux.*

Ovules. — L'étude de l'ovule et de la graine a fait l'objet de nombreux travaux. Citons ceux de Godfrin (1), Harz (2), Holfert (3), Kayser (4) et tout dernièrement de P. Guerin (5). Ces deux derniers auteurs se sont plus spécialement occupés du développement du tégument. Les résultats sont concordants. L'ovule est campylotrope, et ce n'est que dans la région micropylaire que l'on peut établir une distinction entre les deux téguments ; on y trouve huit à dix assises pour le tégument interne. Pendant le développement, le nombre des assises du tégument externe augmente beaucoup, et ces dernières épaississent fortement leurs membranes. Les cellules du tégument interne restent stationnaires et gardent leurs parois minces.

A la maturité, il est excessivement difficile de différencier exactement les téguments.

Dans la région radiculaire, il est cependant assez facile de retrouver l'assise la plus interne du tégument, car en cet endroit aucune résorption n'a eu lieu, et le tégument interne persiste tout entier.

En dehors de la zone micropylaire, les cellules du tégument séminal, plus ou moins fortement comprimées ou résorbées, sont les vestiges de modifications profondes, et l'on ne distingue plus le tégument interne. Kayser ne fait pas mention de l'albumen et admet

(1) Godfrin. *Étude histologique sur les téguments séminaux des Angiospermes*, p. 91-92. Nancy, 1880.

(2) Harz. *Samenkunde*, p. 947-949, 1885.

(3) Holfert. Die Nährschicht der Samenschalen. *Flora*, p. 300, 1890.

(4) Kayser. Beit. z. Kenntniss der Entwickelungsgeschichte der Samen. *Pringsheim's Jahrb. für wiss. Bot.*, t. XXV, p. 117-125, 1893.

(5) P. Guerin. Développement de la graine et en particulier du tégument séminal de quelques Sapindacées. *Jour. bot.*, t. XV, p. 349, 1901.

Digitized by Google

que l'embryon s'applique immédiatement sur l'albumen. P. Guerin a, en effet, montré que ce dernier n'existe pas dans la graine mûre. « Les noyaux d'albumen qui tapissent à un moment donné la paroi du sac embryonnaire ne s'organisent pas en tissu et disparaissent bientôt complètement. »

A tous les stades du développement l'esculine se trouve exclusivement localisée dans les téguments, qui prennent une coloration rouge interne par le réactif de Sonnenschein.

Fruit et graine. — Si l'on étudie la structure anatomique du fruit arrivé à son complet développement on trouve :

Un épiderme peu cutinisé pourvu de poils coniques pluricellulaires principalement situés sur les émergences. Puis un tissu parenchymateux peu dense dont les cellules sont disposées dans le sens radial. Vers le milieu de la surface de la préparation, on rencontre un grand nombre de faisceaux libéro-ligneux coupés obliquement et, enfin, un tissu parenchymateux avec de nombreux méats.

Dans la paroi de ce fruit, l'esculine se localise un peu partout ; mais elle existe surtout en grande quantité dans l'épiderme et au voisinage des faisceaux libéro-ligneux. Le tissu parenchymateux interne est beaucoup moins riche que celui situé sous l'épiderme.

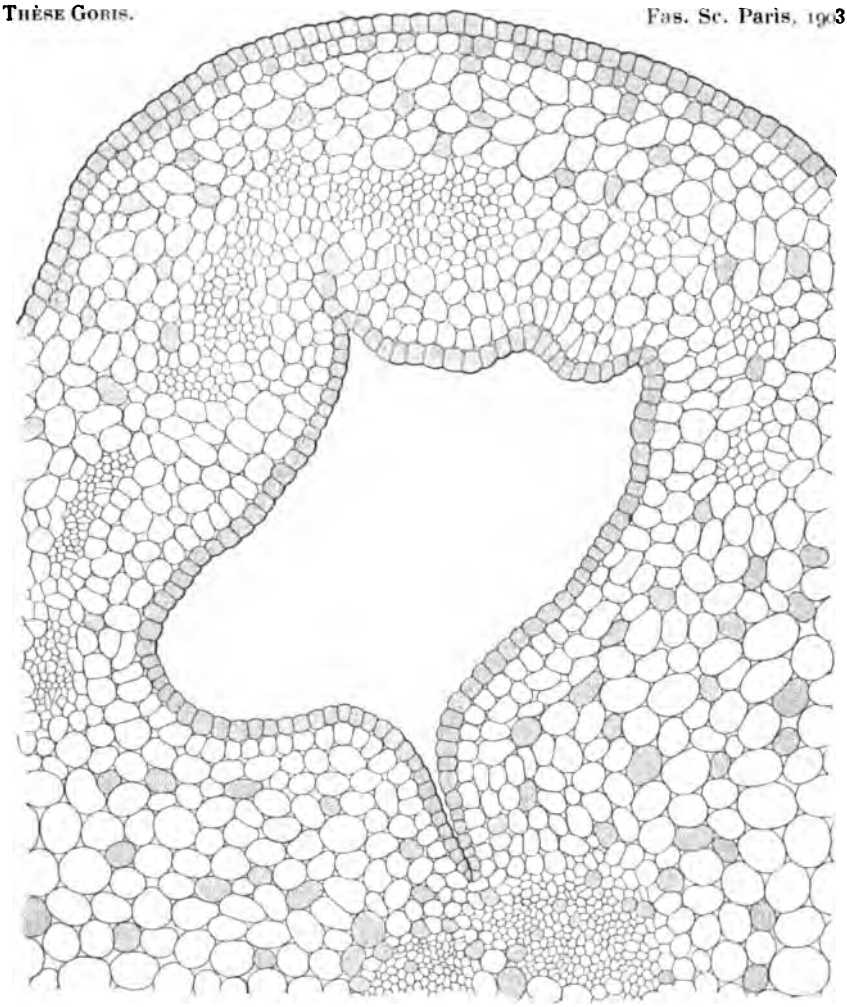
Le tégument de la graine comprend une assise de cellules disposées perpendiculairement à la surface et un nombre variable d'assises de cellules ovoïdes, dont les plus externes ont leurs parois épaissies et probablement subérifiées, car elles restent colorées par le vert d'iode. Tout ce tégument prend une coloration rouge intense par la réaction de Sonnenschein.

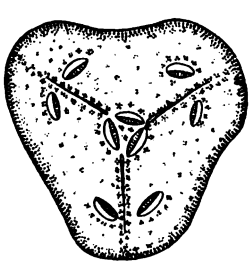
Le cotylédon et la radicule ne laissent déceler aucune trace d'esculine, contrairement à l'opinion émise par Laves (1).

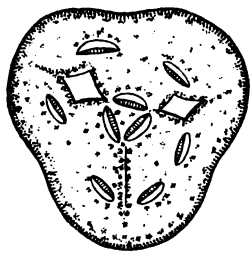
La petite quantité d'esculine que l'auteur allemand prétend avoir trouvé dans ces organes provient très probablement des parcelles du tégument difficiles à séparer de l'embryon dans les graines sèches.

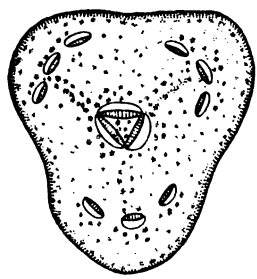
(1) E. Laves. Ueber die Zusammensetzung der Früchte von *Æsculus Hippocastanum*. *Pharmaceut. Centralblatt.*, t. 42 p. 333-336, 1901.

Digitized by Google









2 1

GORIS. Del. BONARD. Sc.

Pl. II. — Structure de la paroi de l'ovaire montrant la localisation. de l'esculine.

FIG. 1, 2, 3. — Schéma de la structure anatomique de l'ovaire avec la répartition de l'esculine aux différents stades du développement.
Le pointillé indique la répartition de l'esculine.

Digitized by Google

Digitized by Google

CHAPITRE III

RÉPARTITION DES CELLULES A ESCULINE DANS LES TISSUS DES ORGANES DÉVELOPPÉS DANS DES CONDITIONS SPÉCIALES

Afin de déterminer le rôle que l'on doit attribuer à l'esculine dans les diverses actions chimiques qui se passent dans la plante, nous nous sommes efforcé de rechercher ses variations, lorsque les conditions de milieu viennent à changer. Nous nous sommes occupé d'abord des feuilles au moment de leur chute. Nous avons ensuite étudié la répartition du glucoside dans les feuilles de seconde pousse et dans des germinations développées à la lumière ou à l'obscurité. Enfin ces expériences furent renouvelées sur de jeunes jets d'une année, développés ensuite à l'abri de la lumière.

Chute des feuilles. — Etudions d'abord la répartition de l'esculine dans les feuilles au moment où elles commencent à jaunir et à se détacher de l'arbre.

En septembre-octobre, la structure anatomique de la feuille, du pétiole, de la tige est à peu près identique à ce que nous avons trouvé au printemps. Le tissu de soutien (péricycle et faisceau ligneux) est cependant plus développé. La localisation de l'esculine, par la réaction de Sonnenschein, se fait très mal ; la coloration obtenue dans les cellules à glucoside est rose, et souvent même, dans les cellules épidermiques, on n'obtient qu'une teinte jaunâtre plus ou moins intense. L'esculine présente la même répartition que dans les organes étudiés au printemps. Toutefois, à la fin d'août, le liber renferme une plus grande quantité de cellules se colorant en rouge violacé. Tout le tissu criblé prend une teinte rose, probablement par suite de la diffusion ; c'est le seul endroit de la préparation où la réaction affecte sa netteté caractéristique.

Digitized by Google

Dans les parenchymes de la nervure médiane et du limbe des feuilles complètement jaunes qui se détachent de l'arbre, la localisation se fait avec encore moins d'intensité. Le liber même n'offre plus une répartition si intense que précédemment.

Les réactifs du tanin ne donnent que des réactions douteuses, et il est difficile de se baser sur les résultats obtenus pour en tirer des conclusions.

En résumé, en automne, l'esculine se trouve en grande quantité dans le liber des rameaux, probablement en voie de transport vers les parties les plus âgées. Si elle existe encore dans les cellules épidermiques, elle y serait sous forme de combinaisons l'empêchant de se colorer par la réaction de Sonnenschein.

Feuilles de deuxième pousse. — Les feuilles de seconde pousse sont de couleur vert jaunâtre et n'atteignent jamais la couleur verte des feuilles du printemps. La localisation a été faite dans le pétiole, la feuille, le pédoncule floral et la fleur.

Dans tous ces organes, la réaction de Sonnenschein se fait facilement, mais elle est beaucoup moins intense que dans les organes développés aux mois d'avril ou mai. Pendant deux automnes consécutifs et à sept ou huit reprises chaque fois nous avons refait cette localisation sans jamais obtenir la coloration rouge vif que l'on obtient avec les organes du printemps.

La structure anatomique est identique à celle des organes que nous avons décrits précédemment. La quantité d'oxalate de chaux est cependant moins grande. L'esculine présente toujours la même répartition. On la rencontre en petite quantité dans tous les parenchymes, mais *l'épiderme*, *l'endoderme*, *la périphérie de la moelle* sont les endroits les plus riches en glucoside.

Bourgeon. — Les écailles du bourgeon, au nombre de 8 ou 10, sont généralement recouvertes d'une matière résineuse particulière. La structure de ces écailles est assez curieuse et diffère totalement d'une feuille ordinaire. Les épidermes sont tous deux glabres, et munis d'organes secréteurs particuliers, producteurs de la résine agglomérant entre eux les écailles protectrices. L'assise sous-épidermique est peu différenciée de la partie sous-jacente. Le mésophylle est constitué comme un parenchyme homogène dans lequel on trouve des faisceaux libéro-ligneux entourés chacun par un

Digitized by Google

endoderme particulier. Le bois de ces vaisseaux est réduit à quelques trachées. Les cristaux d'oxalate de chaux en mâcles sont assez nombreux dans le parenchyme.

L'esculine se trouve localisée dans les épidermes et les assises sous-épidermiques, dans l'endoderme des faisceaux et dans quelques rares cellules de parenchyme ligneux. Dans le mésophylle, elle est dispersée un peu çà et là sans ordre apparent (Pl. X., fig. 2).

Les petites feuilles du bourgeon contiennent déjà de l'esculine mais en faible quantité.

Rameau. — Les petits rameaux qui s'échappent du tronc possèdent la même structure que le rameau principal de première année. Le péricycle est un peu moins sclérifié, le collenchyme sous-épidermique n'existe pas, les poils sont nombreux, le bois très peu ligneux est réduit à ses vaisseaux avec très peu de parenchyme lignifié, la moelle est développée.

Les pétioles et les feuilles issus de ces rameaux offrent une structure analogue aux organes correspondants sur laquelle il est inutile d'insister à nouveau.

Dans les tissus de ces organes la proportion des cellules qui donnent la réaction de l'esculine est plus grande que dans les autres organes étudiés jusqu'ici. En particulier le parenchyme cortical et la moelle qui, dans la tige et le pétiole, sont relativement pauvres en glucoside, sont dans ce cas abondamment pourvus de cellules qui donnent la réaction. Bien qu'il soit difficile de fixer des chiffres, le simple examen microscopique permet de voir que le nombre des cellules qui sont colorées en rouge est environ trois fois plus fort que dans un organe adulte correspondant. Aussi les rameaux qui s'échappent du tronc sont-ils d'excellents matériaux pour l'étude des réactions microchimiques de l'esculine.

REJETS D'UNE ANNÉE DÉVELOPPÉS A L'ABRI DE LA LUMIÈRE

Au printemps, de jeunes marronniers provenant de germinations de l'année précédente furent placés en pleine terre, et recouverts d'une cloche noire empêchant tout accès de lumière. Ces jets se développèrent rapidement, et le bourgeon terminal de la tige verte

Digitized by Google

ne tarda pas à donner naissance à une tige jaune étiolée, dont les rameaux grêles et fragiles présentaient un aspect des plus curieux.

La localisation de l'esculine fut faite à l'endroit de la séparation des deux rameaux.

A. *Tige de l'année précédente.* — La tige de l'année précédente montre un suber de 5 à 6 assises de cellules ne donnant pas la réaction de Sonnenschein. Le phelloderme renferme de l'esculine en abondance ; mais la réaction ne se produit jamais au delà de la troisième rangée de cellules, qui, elle-même, n'en renferme pas d'une façon continue. Le parenchyme cortical et la moelle sont pauvres en cellules à glucoside.

L'endoderme, la périphérie de la moelle, le parenchyme libérien présentent la même répartition que dans un organe adulte.

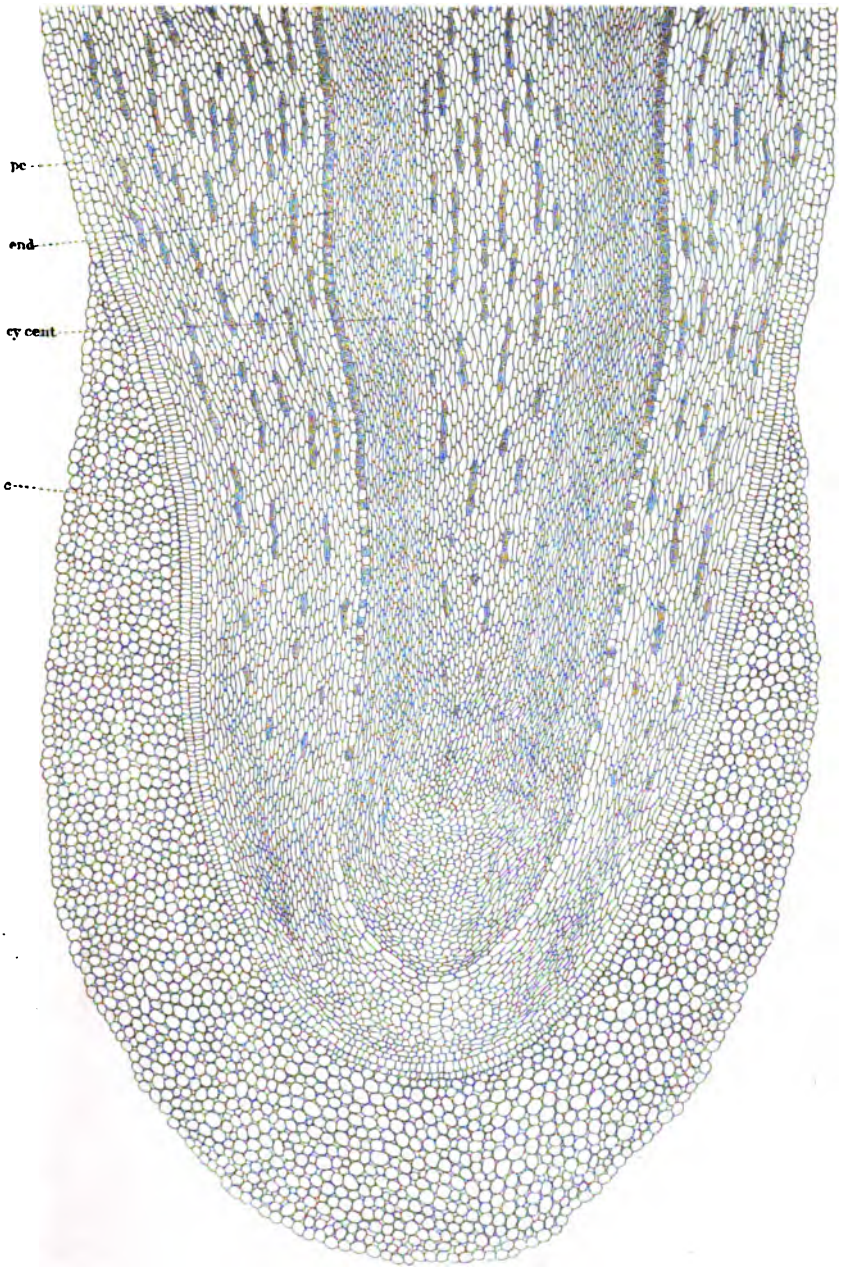
B. *Tige étiolée.* — Dans la tige étiolée nous trouvons : un épiderme avec des poils unicellulaires assez nombreux. Certaines cellules épidermiques commencent à se cloisonner pour donner l'assise subéro-phellodermique. L'épiderme et les 4 ou 5 premières assises sous-épidermiques, contrairement à ce que nous avons trouvé dans le cas précédent, sont riches en esculine. Le parenchyme cortical et la moelle renferment également un plus grand nombre de cellules qui se colorent en rouge par l'action du réactif. L'endoderme, la périphérie de la moelle, le parenchyme libérien n'offrent pas une répartition plus grande que précédemment.

En résumé, l'organe étiolé renferme un plus grand nombre de cellules qui donnent la réaction de l'esculine. La différence s'accentue principalement dans les assises sous-épidermiques, le parenchyme cortical et la moelle.

Germination. — Des graines de Marronnier furent mises à germer, afin de déterminer à quelle époque de la végétation apparaissait l'esculine.

Nous avons vu que ce glucoside ne se trouve que dans le tégument de la graine, on ne le rencontre jamais dans l'embryon. Pendant la germination, les téguments ne jouant qu'un rôle de protection, il était donc bien facile de saisir exactement le moment où le glucoside ferait son apparition.

Digitized by Google



A. Goris. Del. A. Duval. Sc.

Pl. III. — Structure de l'extrémité de la radicule, avec la localisation de l'esculine.

pc, parenchyme cortical ; *end*, endoderme ; *cy. cent*, cylindre central ; *c*, coiffe,

Digitized by Google

Digitized by Google

Nous avons donc étudié la localisation dans une jeune racine qui avait atteint environ 10 centimètres de longueur.

Une coupe transversale faite à 4 ou 5 centimètres de l'extrémité de la racine nous a montré la structure suivante : un épiderme peu différencié sans cuticule, formé de cellules très petites par rapport aux éléments sous-jacents. Un parenchyme cortical, sans cristaux, formé de cellules arrondies laissant de nombreux méats entre elles. L'endoderme est très nettement visible ; le péricycle, déjà dédoublé, n'est pas encore sclérifié. Les faisceaux ligneux en voie de formation sont disposés en cercle autour d'une moelle très développée.

L'assise la plus externe de cette préparation ne renferme pas d'esculine. Les assises sous-épidermiques, au contraire, sont assez riches en glucoside. *Toutes les cellules endodermiques et la plupart des cellules situées au-dessus de cette assise se colorent en rouge violacé.* Le parenchyme cortical et libérien, le parenchyme ligneux au voisinage des trachées présentent quelques rares cellules à esculine. *Dans la moelle elle se répartit un peu partout en assez grande abondance, sans se localiser spécialement à la périphérie, comme cela se produit dans les organes aériens* (Pl. XI, fig. 1).

A 1 centimètre de distance de l'extrémité de la racine, la structure anatomique présente trois zones bien distinctes.

Vers l'extérieur, on trouve 3 ou 4 assises de cellules polyédriques séparées du parenchyme cortical par une rangée de cellules fortement allongées radialement.

Puis, vient une zone représentant le parenchyme cortical formé de cellules polyédriques ne laissant entre elles que des méats excessivement petits.

Vers l'intérieur l'endoderme n'est pas encore différencié, sauf en quelques rares endroits, et en se rapprochant de l'extrémité, il est impossible de le distinguer. La deuxième zone est un tissu en voie de différenciation ; on y rencontre quelques tubes criblés reconnaissables à leurs parois nacrées. La moelle est formée de cellules complètement polyédrique sans méats. Il n'y a pas de cristaux d'oxalate de chaux dans cette préparation.

L'esculine se trouve localisée dans le parenchyme cortical, principalement vers la partie interne où va se différencier l'endoderme. On en trouve peu vers la partie externe, et il n'y en a jamais dans

Digitized by Google

les cellules allongées radialement ni dans le tissu situé au-dessus de cette assise. La deuxième zone, où se différencient les faisceaux

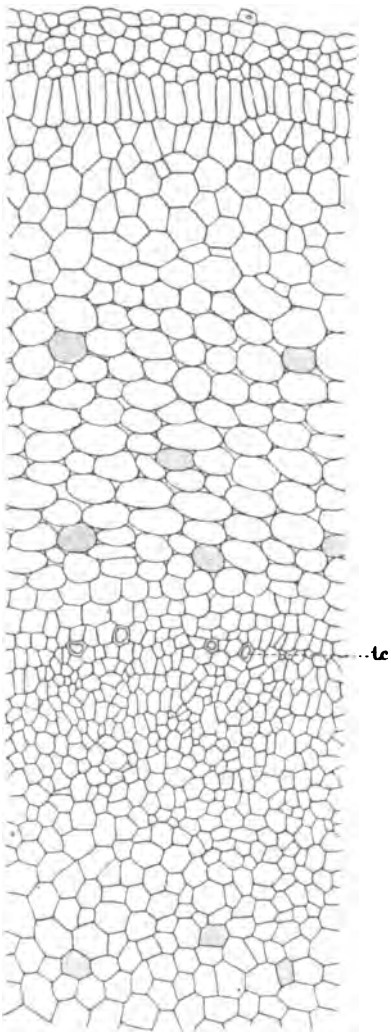


FIG. 5. — Structure anatomique de l'extrémité de la radicule (germination).

Les cellules marquées de pointillé représentent les cellules à esculine.

tc, tubes criblés.

Digitized by Google

libéro-ligneux, n'en renferme pas. Dans la moelle, la réaction est assez intense, mais les cellules sont disposées un peu sans ordre et n'affectent pas encore cette élection particulière au pourtour des faisceaux que nous avons indiquée dans presque tous les tissus.

Très près de l'extrémité, la structure est identique. Seul le tissu

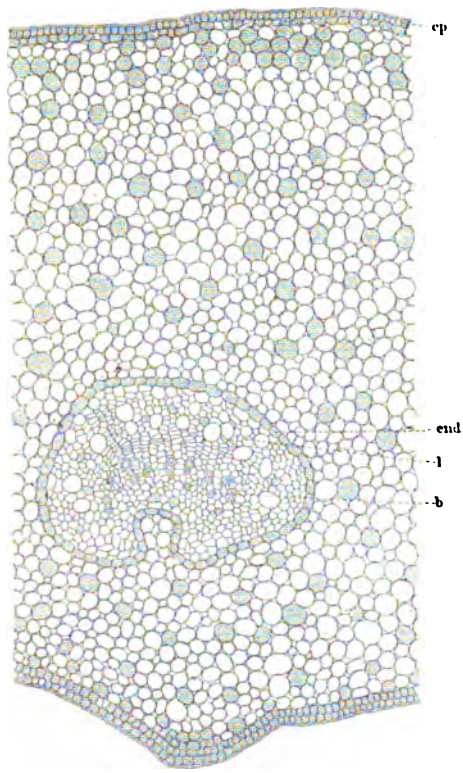


Fig. 6. — Structure anatomique du pétiole cotylédonaire montrant la localisation de l'esculine.

ep, épiderme ; — *end*, endoderme ; — *l*, liber ; *b*, bois.

situé au-dessus de l'assise à cellules allongées radialement est beaucoup plus développé. *Le réactif de Sonnenschein ne décèle aucune trace d'esculine dans cette préparation.* La figure 5 nous montre la structure anatomique de la radicule, près de son extrémité. Il y a encore quelques rares cellules qui se colorent en rouge.

Digitized by Google

Une coupe longitudinale de l'extrémité de la racine permet l'explication de cette structure et de la répartition de l'esculine (Pl. III). En C, nous voyons la coiffe en train de s'exfolier; c'est le tissu qui, dans les coupes transversales, est situé au-dessus des cellules allongées radialement; D représente le parenchyme cortical, et F le cylindre central. *Nous voyons de suite que le point végétatif ne renferme pas de glucoside.* A une petite distance de l'extrémité elle apparaît dans le parenchyme cortical et la moelle.

Quelques millimètres plus haut l'endoderme est différencié, l'esculine s'y localise et tend en outre à gagner la partie épidermique.

Pétiole cotylédonaire. — Pendant le développement considérable de la radicule, la tigelle ne s'accroît pas énormément Les cotylédons ne s'épanouissent pas et restent enfermés dans le tégument. Par la suite, tigelle et gemmule s'allongent, et les pétioles cotylédonaires s'écartent pour les laisser sortir (fig. 6).

Le pétiole cotylédonaire est semi-cylindrique et possède la structure suivante : sous un épiderme, dépourvu de poils, on trouve un parenchyme homogène traversé par 3 ou 5 faisceaux libéro-ligneux possédant chacun un endoderme particulier. L'esculine se localise dans l'épiderme, l'endoderme des faisceaux et en très petite quantité dans le parenchyme libérien. Dans le parenchyme, elle est dispersée un peu sans ordre apparent.

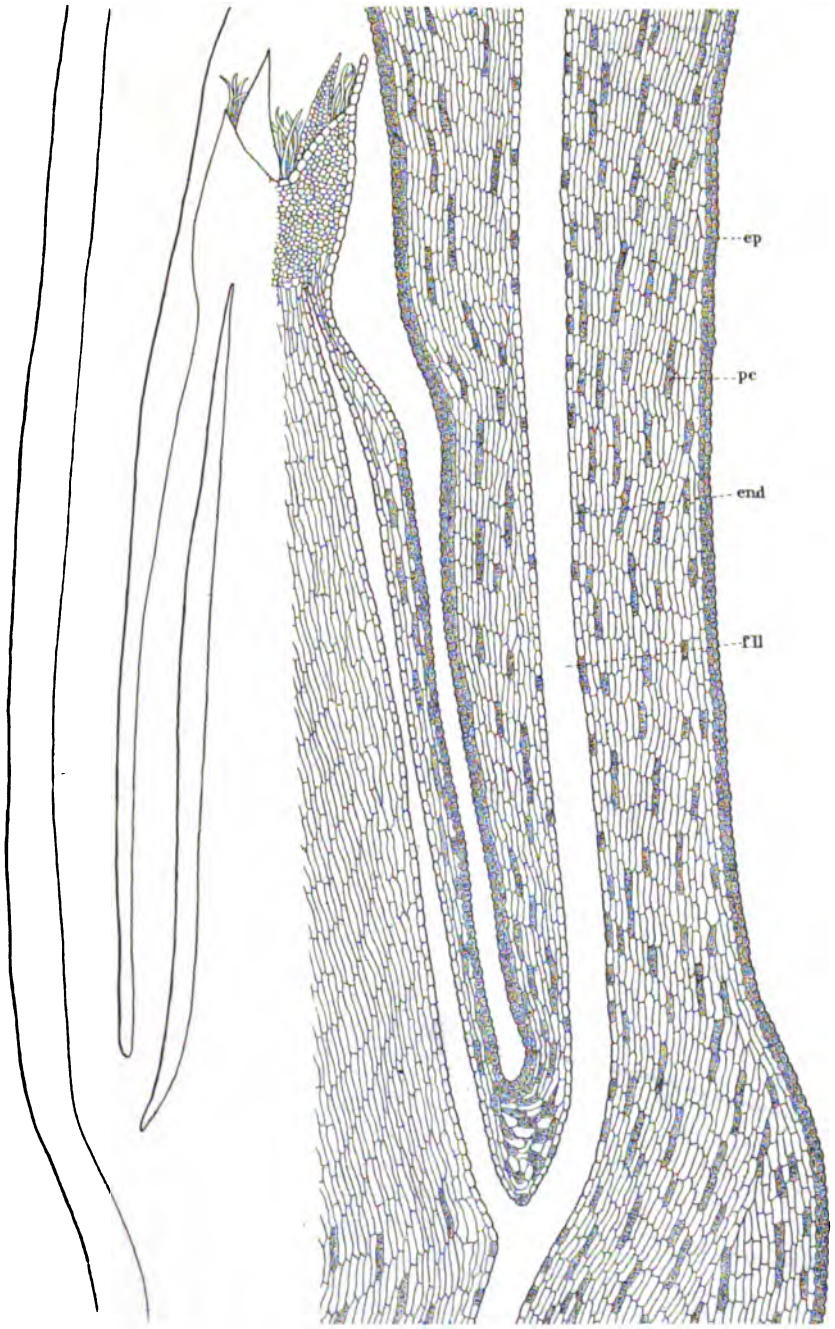
Gemmule. — La structure de la gemmule est également intéressante à étudier. La tigelle montre : un épiderme et 2 à 3 assises sous-épidermiques déjà bien différenciées, un parenchyme cortical peu développé. L'endoderme est très apparent, et le péricycle déjà dédoublé n'est pas encore fibreux.

Le faisceau libéro-ligneux est peu développé ; le bois peu lignifié se réduit à quelques vaisseaux spiralés, situés à la pointe du faisceau. La moelle est assez développée, et on ne rencontre pas de cristaux d'oxalate de chaux dans tous ces tissus.

L'esculine se trouve localisée dans l'épiderme, l'endoderme et la périphérie de la moelle. Les parenchymes en renferment excessivement peu.

La jeune feuille a une structure très voisine de celle déjà décrite. L'épiderme possède des poils unicellulaires et des poils capités pluricellulaires et plurisériés; ces derniers sont principalement situés

Digitized by Google



A. GORIS Del. BONARD. Sc.

Pl. IV. — Localisation de l'esculine dans l'extrémité de la tigelle (germination).
ep, épiderme; *pc*, parenchyme cortical ; *end*, endoderme ; *fll*, faisceau libéro-ligneux.

Digitized by Google

Digitized by Google

sur l'épiderme supérieur au-dessus du collenchyme de la nervure médiane. Le parenchyme cortical, l'endoderme, le péricycle, le faisceau libéro-ligneux présentent la même disposition anatomique que dans la tigelle, ce qui nous dispense d'insister.

L'esculine se trouve disposée suivant trois lignes concentriques constituées par l'épiderme, l'endoderme et le pourtour de la moelle. Il n'en existe que très rarement dans les parenchymes (Pl. X, fig. 1).

Il est intéressant de savoir à quel instant précis de la germination apparaît l'esculine. Nous avons suivi jour par jour, en faisant des examens microchimiques, les modifications chimiques se produisant dans les graines mises à germer. On a déjà insisté sur ce fait que, dans la graine, l'embryon ne renferme jamais de glucoside.

Si nous recherchons l'esculine dans une germination, nous voyons que ce produit apparaît dès que la radicule a percé le tégument.

Dans l'embryon, on la rencontre dans l'endoderme des faisceaux voisins de la radicule (Pl. X, fig. 3), alors qu'on ne peut la déceler dans les faisceaux situés dans l'intérieur même des cotylédons.

Le pétiole cotylédonaire et la radicule présentent déjà une répartition à peu près analogue à celle signalée précédemment.

La figure (Pl. IV) nous donne la localisation de l'esculine dans la tigelle. Ce produit se localise principalement dans *l'épiderme et les assises sous-épidermiques*. On n'en trouve ni dans le faisceau ni dans la moelle.

L'extrémité de la tigelle est dépourvue d'esculine. Ici comme dans la *racine le point végétatif ne renferme pas de glucoside.*

Germination à 2 et 4 feuilles. — Nous avons examiné la répartitition de l'esculine dans des germinations ayant donné naissance à de jeunes plantes et possédant 2 et même 4 feuilles.

Dans tous les tissus de ces différents organes l'esculine affecte la même répartition déjà signalée dans les organes adultes. Il en existe un peu dans tous les parenchymes, mais *l'épiderme, l'endoderme et la périphérie de la moelle sont toujours les endroits où elle se trouve localisée de préférence.*

A ce stade de développement, les cotylédons restent attachés à la jeune plante et ne sont pas encore complètement assimilés.

La réaction de Sonnenschein ne décèle pas trace d'esculine dans

Digitized by Google

tout ce tissu. Il n'en existe que dans l'épiderme, et l'endoderme des faisceaux au voisinage des pétioles cotylédonaires.

Germination à l'obscurité. — Les mêmes expériences furent répétées sur des graines mises à se développer à l'obscurité. Les localisations de l'esculine, faites aux différents stades que nous venons d'étudier, ont donné des résultats identiques à ceux obtenus avec des plantes développées normalement.

Il est intéressant de voir que la lumière ne joue aucun rôle dans l'apparition de l'esculine, sa formation peut parfaitement se faire dans l'obscurité au moyen de matériaux accumulés dans l'embryon.

Nous avons déjà dit que ces plantes, développées à l'obscurité, étaient des matériaux à recommander pour l'étude des réactions de l'esculine. Dans ces échantillons, la localisation se fait d'une façon précise et caractéristique, et ils nous ont beaucoup servi pour étudier la couleur des précipités et essayer la valeur des réactifs.

Digitized by Google

CHAPITRE IV

I. — ACIDE ESCULITANNIQUE. SA LOCALISATION. — II. — SA RÉPARTITION DANS LE VÉGÉTAL. — III. — SES RAPPORTS AVEC L'ESCULINE

Le tanin de l'écorce de marronnier (acide esculitannique) a pour formule $C^{26}H^{24}O^{12}$. Il existe dans tous les organes de la plante, écorce de la racine et du tronc, écailles des bourgeons, feuilles, fleurs. Dans la capsule du fruit, il se trouve concurremment avec un tanin particulier, l'acide capsulœscinique, qui aurait les réactions de l'acide gallique et correspondrait comme constitution à l'acide triacétylgallique.

Étudié par Rocheleder et Nass, l'acide esculitannique se présente à l'état pur sous forme d'une masse incolore, amorphe, inodore ; il est fortement astringent, très soluble dans l'eau, l'alcool et l'éther. Ses solutions aqueuses au contact de l'air et surtout en présence d'alcalis prennent une coloration brun rougeâtre. Par le perchlorure de fer la solution aqueuse se colore en beau vert que l'addition d'un alcali libre fait virer au violet. Contrairement à la plupart des tanins, il n'est pas précipité par l'émétique, mais il précipite par l'addition de certains sels neutres, l'acétate de plomb, l'acétate d'alumine, le bichromate de potasse et aussi par la gélatine.

Soumis à l'ébullition avec un acide minéral étendu (acide chlorhydrique), il se produit une magnifique coloration rouge cerise, et finalement il se sépare une substance rouge floconneuse, « le rouge de marron ». Par fusion en présence de chaux, l'acide esculitannique et le rouge de marron se décomposent en donnant de la phloroglucine et de l'acide protocatéchique.

Digitized by Google

Localisation. Réactifs.

La seule réaction caractéristique de ce tanin est l'action simultanée d'un sel de 1er et de la potasse, réaction qui réussit mal en microchimie si l'on se sert de perchlorure de fer, mais qui se fait beaucoup mieux si l'on emploie le sulfate de fer dans certaines conditions.

La localisation obtenue quand on place la coupe en présence d'un cristal de sulfate de fer dans un verre de montre rempli d'eau, n'est pas précise. Avant que le sel de fer ait eu le temps de s'oxyder, l'acide esculitannique s'est rapidement diffusé, de sorte que la coloration se produit surtout sur les membranes, et, quand on ajoute ensuite la potasse, la préparation tout entière et principalement les parois des cellules prennent une coloration violette. Il est préférable, pour obtenir un bon résultat, d'opérer en milieu glycériné (glycérine 2 p., eau 1 p.). L'oxydation du sel ferreux peut se produire, et dans ces conditions l'acide esculitannique ne peut diffuser que très difficilement. Quand la coupe a pris une teinte verte, on la plonge dans une solution de potasse après un rapide lavage.

Cette réaction de l'acide esculitannique est assez difficile à effectuer et demande surtout beaucoup de temps et d'attention, aussi est-il bon de ne l'employer que comme moyen de contrôle, et de se servir pour cette localisation des réactifs ordinaires des tanins, tels que :

1° Réactif de Bræmer.	Tungstate de soude	10
	Acétate de soude	20
	Eau	100
2° Réactif de Carpene.	Oxyde de zinc	40
	Eau	50 cm³
	Acide acétique	65 cm³
	Dissoudre à chaud, et ajouter :	
	Ammoniaque	100 cm³
	Eau distillée, q. s. pour	500 cm³

3° Bichromate de potasse. Solution aqueuse à 5 p. 100.
4° Acétate d'urane. Solution aqueuse saturée.
5° Molybdate d'ammoniaque. Solution aqueuse à 20 p. 100.
6° Arséniate de soude. Solution aqueuse à 10 p. 100.
7° Perchlorure de fer en solution concentrée ou diluée.

Digitized by Google

8° Réactif de Gautier. Solution aqueuse d'acétate de cuivre au 1/30.
9° Cyanure de potassium. Solution faite extemporanément.
10° Eau de baryte.
11° Eau de chaux.

Avant d'employer chacun de ces réactifs à la recherche de l'acide esculitannique, il était indispensable de savoir s'ils n'avaient aucune action sur l'esculine. Les mélanges de ces réactifs avec le glucoside conservés pendant deux ans dans des petites ampoules n'ont pas varié. Comme l'indique le tableau ci-dessous, seul le perchlorure de fer a donné une légère coloration verdâtre ; aussi ne l'avons-nous employé que très rarement.

RÉACTIF	ACTION SUR L'ESCULINE	ACTION SUR L'ACIDE ESCULITANNIQUE
1 Sulfate ferreux.....	Rien.	Précipité verdâtre au bout de peu de temps.
2 Réactif de Bræmer.....	Pas de précipité, augmentation de la fluorescence.	Précipité brun marron.
3 Réactif de Carpene	id.	Précipité noirâtre.
4 Bichromate de potasse.	Pas de précipité.	Précipité marron.
5 Acétate d'urane.....	Pas de précipité, coloration rose très fugace.	Précipité rouge ocreux.
6 Molybdate d'ammoniaque.....	Pas de précipité.	Précipité jaunâtre.
7 Perchlorure de fer.....	Coloration verdâtre.	Précipité noir verdâtre.
8 Arséniate de soude.....	Pas de précipité.	Précipité rosé.
9 Réactif de Gautier.....	id.	Précipité noirâtre.
10 Cyanure de potassium.	Pas de précipité, augmentation de la fluorescence.	Précipité rosé.
11 Eau de baryte.....	id.	Précipité noirâtre.
12 Eau de chaux.....	id.	id.

Digitized by Google

Méthodes de localisation.

Deux méthodes peuvent être employées pour la localisation de l'acide esculitannique :

1° Plonger les coupes dans les réactifs pendant un temps variable, parfois environ une heure ;

2° Immerger les parties de la plante que l'on veut étudier dans le réactif, qui, en pénétrant par osmose dans les tissus, y produit directement la précipitation dans les cellules.

Les deux méthodes ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients ; nous allons les examiner en détail.

1° **Méthode par osmose.** — Pour ces différents essais, nous nous sommes adressé à de jeunes plantes provenant soit des germinations, soit de jeunes pousses développées à l'obscurité. Les échantillons de 3 à 5 millimètres de diamètre et de 5 centimètres de longueur furent plongés dans les réactifs et les coupes faites dans la région moyenne de l'échantillon à des intervalles de temps variables de 4, 16, 18, 40, 64 heures et même quatre mois. Les résultats ainsi obtenus sont exposés dans le tableau ci-dessous :

Arséniate de soude. Précipité granuleux que l'on peut facilement examiner après 28 heures de contact.	Après 4 h. — Localisation commence à se faire, quelques cellules prennent une teinte jaunâtre. — 10 h. — Localisation franchement apparente. — 28 h. — Localisation intense, complète. — 40 h. — — — — 64 h. — — — — 1 mois. — Localisation encore nette, mais les tissus sont altérés.

Digitized by Google

Molybdate d'ammoniaque. Coloration jaune et jaune orange. *Excellent réactif.*	Après 4 h. — Localisation bien accusée coloration jaune et jaune orange de toutes les cellules. — 16 h. — Localisation très nette. — 28 h. — — — 40 h. — — — 64 h. — — — 1 mois. — La localisation est encore nette, mais les tissus sont fortement altérés, et il est assez difficile de faire et d'examiner la préparation.
Cyanure de potassium. Précipité granuleux.	Après 4 h. — Commencement de localisation. — 16 h. — La localisation commence à s'accuser. — 28 h. — Localisation bien délimitée. — 40 h. — Localisation terminée, très nette. — 64 h. — Le tissu commence à devenir flasque. — 1 mois. — Localisation existe toujours, mais les tissus sont tellement altérés qu'on ne peut plus examiner l'échantillon.
Réactif de Bræmer. Précipité granuleux. *Bon réactif.*	Après 4 h. — Localisation à peine commencée. — 16 h. — Localisation bien accusée. — 28 h. — Localisation très nette. — 40 h. — Localisation complète et intense. — 64 h. — Localisation complète et intense. — 1 mois. — Très belles localisations sur lesquelles on peut encore étudier l'aspect du précipité.

Digitized by Google

Réactif de Carpene. Précipité granuleux. *Bon réactif.*	Après 4 h. — Localisation bien délimitée presque terminée. — 16 h. — Localisation très nette. — 28 h. — — — 40 h. — — — 64 h. — — — 1 mois. — Le tissu est presque détruit, et il est impossible d'y pratiquer des coupes.
Eau de baryte. Précipité granuleux.	Après 4 h. — Localisation bien délimitée. — 16 h. — — — 18 h. — Localisation intense et complète. — 40 h. — — — — 64 h. — — — — 1 mois. — Localisation existe encore, mais les tissus sont fortement altérés.
Eau de chaux. Précipité granuleux. Réactif médiocre dans ce cas et très lent à agir.	Après 4 h. — Commencement de localisation. — 16 h. — La localisation s'accuse très bien. — 28 h. — Localisation complète. — 40 h. — — — 64 h. — — — 1 mois. — La localisation existe toujours, mais les tissus sont altérés.
Perchlorure de fer. Précipité verdâtre dans la cellule.	**Concentré.** — Au bout de 4 heures, toutes les cellules sont colorées en noir verdâtre, la localisation est terminée. Au bout de 4 mois, le tissu est détruit. **Dilué.** — Pénètre très difficilement dans l'échantillon. Cette réaction est celle qui permet le mieux de s'assurer que l'osmose ne se fait pas par la surface épidermique. La précipitation commence par les deux extrémités; l'échantillon reste pendant très longtemps intact en son milieu, et il faut plusieurs jours pour que la réaction soit complète dans un échantillon de 5 centimètres de longueur.

Digitized by Google

Acétate d'Urane. Précipité granuleux. *Très mauvais réactif.*	Après 4 h.	— Pas de localisation, sauf dans quelques rares cellules épidermiques.
	— 16 h.	— Pas de localisation, sauf dans quelques rares cellules épidermiques.
	— 28 h.	— Localisation à peine commencée.
	— 40 h.	— — —
	— 64 h.	— Localisation très mauvaise.
	— 1 mois.	— Localisation. Ce réactif n'est pas à recommander dans ce cas.
Réactif de Gautier. Précipité granuleux. *Excellent réactif.*	Après 4 h.	— Pas de localisation.
	— 16 h.	— Commencement de localisation.
	— 28 h.	— Localisation bien accusée, non encore terminée.
	— 40 h.	— Localisation complète et très nette.
	— 64 h.	— — —
	— 1 mois.	— Bonne localisation.
Bichromate de potasse. Précipité granuleux. *Excellent réactif.*	Après 4 h.	— La localisation commence et s'accuse bien.
	— 16 h.	— Localisation très nette et complète.
	— 28 h.	— — —
	— 40 h.	— — —
	— 64 h.	— — —
	— 1 mois.	— Très bonne localisation.

De ces réactions on doit conclure que pour étudier la localisation de l'acide esculitannique par osmose, il faut avoir recours aux réactifs suivants : bichromate de potasse, réactif de Gautier, molybdate d'ammoniaque, arséniate de soude, et réactif de Bræmer. Les trois premiers réactifs seront employés lorsque nous nous trouverons en présence d'un grand nombre d'échantillons à traiter à la fois ; au contraire, si nous voulons étudier l'aspect du précipité dans la cellule même, le réactif de Bræmer et l'arséniate de soude sont préférables ; toutefois, ces deux derniers sont très longs à agir.

Digitized by Google

2° **Méthode par contact direct des coupes avec le réactif.** — Elle consiste à plonger les coupes dans les réactifs indiqués.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus :

Arséniate de soude.	Après 1 m. — Rien. — 5 m. — La localisation est à peine commencée. — 20 m. — Localisation complète. — 30 m. — —
Réactif de Bræmer. *Bon réactif.*	Après 1 m. — La localisation est à peine commencée. — 5 m. — La localisation commence à s'accuser. — 20 m. — La localisation n'est pas encore complète. — 30 m. — Très bonne localisation.
Molybdate d'ammoniaque. *Excellent réactif.*	Après 1 m. — La localisation s'accuse. — 5 m. — Localisation complète. — 20 m. — Localisation complète et très intense. — 30 m. — — —
Cyanure de potassium.	Après 1 m. — Pas de localisation. — 5 m. — La localisation est à peine commencée. — 20 m. — — — — 30 m. — Mauvaise localisation.
Réactif de Carpene. *Très bon réactif.*	Après 1 m. — Commencement de localisation. — 5 m. — Précipité grenu dans les cellules. La localisation est nettement accusée. — 20 m. — Localisation complète. — 30 m. — — très nette.
Eau de baryte. *Bon réactif.*	Après 1 m. — La localisation est commencée. — 5 m. — Localisation bien accusée mais pas encore complète. — 20 m. — Très nette. — 30 m. — —

Digitized by Google

Eau de chaux. *Bon réactif.*	Après 1 m. — Commencement de localisation. — 5 m. — La localisation continue et se délimite très bien. — 20 m. — Localisation complète. — 30 m. — Localisation très nette.
Perchlorure de fer.	**Concentré.** — Localisation immédiate. Les cellules sont brusquement attaquées et il n'y a pas de diffusion. **Dilué.** — Après 1 m. — La localisation est commencée. Après 5 m. — La localisation est complète. Après 20 m. — — Après 30 m. — —
Sulfate de fer.	Après 1 m. — Commencement de coloration. — 5 m. — Coloration verte de toute la coupe, sans localisation bien nette. — 20 m. — — — — 30 m. — — —
Acétate d'urane. *Très bon réactif par cette méthode.*	Après 1 m. — La localisation est à peine commencée. — 5 m. — Localisation bien délimitée. — 20 m. — La localisation est très nette et complète. — 30 m. — Très belle localisation.
Réactif de Gautier.	Après 1 h. — La localisation est commencée. — 5 m. — Localisation bien accusée presque terminée. — 20 m. — Localisation très bonne. — 30 m. — —
Bichromate de potasse.	Après 1 m. — La localisation est commencée. — 5 m. — La localisation est presque complète. — 20 m. — Très bonne localisation. — 30 m. — —

Digitized by Google

Il est nécessaire de ne pas faire de coupes trop minces, ni de tomber dans l'excès contraire. Il faut un juste milieu que la pratique se charge de faire connaître rapidement. Pour cette méthode, nous recommandons les réactifs à bases alcalines dans l'ordre suivant : Molybdate d'ammoniaque, arséniate de soude et réactif de Brœmer, ou parmi les autres sels le bichromate de potasse, l'acétate d'urane, le réactif de Gautier, le perchlorure de fer concentré.

Il est assez curieux de voir que l'acétate d'urane, qui donnait de mauvais résultats dans la méthode précédente, est dans ce cas un excellent réactif. Cela provient probablement de la difficulté des échanges osmotiques.

Le perchlorure de fer concentré est aussi d'un emploi commode ; avec lui les cellules renfermant le tanin sont brusquement attaquées et il n'y a pas à craindre la diffusion comme avec le sulfate ferreux et même avec le perchlorure de fer dilué.

Chacune des méthodes décrites ci-dessus présente des avantages et des inconvénients. La méthode par contact direct permet de suivre simultanément la localisation de l'acide esculitannique et de l'esculine, puisqu'il est facile de prélever alternativement des coupes qui seront soumises à la réaction de Sonnenschein ou aux réactifs du tanin, mais elle a le grand défaut de ne pouvoir fixer toutes les cellules renfermant l'acide esculitannique et en particulier les cellules épidermiques, dont le contenu disparaît quand le rasoir entame le tissu. La méthode par osmose supprime ce dernier inconvénient et permet d'obtenir des coupes beaucoup plus fines. Si elle est longue, ce défaut devient presque un avantage lorsque l'abondance de matériaux ne permet pas d'entreprendre beaucoup de localisations à la fois. Ce n'est qu'en combinant les deux méthodes qu'on arrive à s'en servir le plus avantageusement possible.

Répartition du tanin. — Ses rapports avec l'esculine.

Les conditions de la localisation du tanin étant ainsi bien établies, quelle est la répartition de l'acide esculitannique ?

Digitized by Google

On est de suite frappé par la grande concordance que présente la localisation du tanin et de l'esculine.

C'est ainsi qu'on le rencontre dans tous les parenchymes et particulièrement en abondance dans *l'épiderme, l'endoderme et la zone périphérique médullaire.* La même remarque s'applique aux différents organes, partout les réactions du tanin nous donnent une localisation identique à celle de l'esculine.

Dans les cotylédons qui sont privés d'esculine, il n'y a pas de tanin. Pendant la germination, dès qu'apparaît l'esculine on peut mettre aussitôt en évidence la présence de l'acide esculitannique.

L'apparition de l'esculine et du tanin est simultanée dans le végétal.

L'expérience suivante prouve que l'esculine et le tanin sont renfermés dans les mêmes cellules. Pour cela des coupes sont abandonnées dans le molybdate d'ammoniaque pendant une à trois minutes et on prélève une d'entre elles que l'on examine pour suivre le progrès de la réaction chimique; lorsque la localisation paraît avoir une netteté suffisante, on passe rapidement les coupes à l'eau et on les traite par la réaction de Sonnenschein. Toutes les cellules à acide esculitannique, qui étaient jaunes sous l'action du molybdate, prennent une coloration rouge caractéristique de l'esculine.

On peut même réaliser l'expérience d'une façon plus convaincante encore. Il suffit de prendre une coupe assez large, de la traiter par le molybdate d'ammoniaque pendant une à deux minutes ; puis de l'enlever à l'aide d'une pince fine, et d'en plonger la moitié d'abord dans l'acide azotique, puis dans l'ammoniaque. On lave et on monte la préparation aussitôt. La moitié de la coupe sera colorée en rouge, l'autre en jaune, et à la limite de séparation on pourra voir des cellules de teinte intermédiaire.

On peut également refaire ces expériences en employant le réactif de Brœmer, l'arséniate de soude, le réactif de Gautier ou mieux encore l'eau de chaux et l'eau de baryte, mais il faut laisser les coupes dans ces réactifs un temps variable avec chacun d'eux; temps que l'expérience seule peut déterminer.

Sous quelle forme l'esculine et l'acide esculitannique existent-ils dans la plante? On ne peut guère émettre que trois hypothèses

Digitized by Google

plausibles : 1° l'acide esculitannique et l'esculine sont libres ; 2° ces deux corps sont totalement combinés ; 3° l'acide esculitannique et l'esculine sont en partie combinés et en partie libres ou en voie de combinaison.

Détermination de la forme sous laquelle l'esculine et l'acide esculitannique existent dans la plante.

A notre avis l'acide esculitannique existe dans la plante sous forme de combinaison avec l'esculine (esculitannate d'esculine), et le principe tannoïde qui existe dans la cellule végétale n'est pas l'acide esculitannique pur, mais bien un composé complexe dans lequel entre la molécule d'esculine. Sous des influences particulières, ébullition avec l'eau, action des alcalis, il se dédouble en donnant de l'esculine et de l'acide esculitannique.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons encore eu recours à la méthode microchimique.

On sait que l'esculine est peu soluble dans l'eau et insoluble dans l'alcool absolu. Par conséquent, des coupes plongées pendant quelque temps dans l'eau ou l'alcool absolu ne devraient fournir que la réaction de l'esculine.

En réalité, il n'en est rien car, après un séjour de deux à trois minutes dans l'eau ou l'alcool, les coupes soumises au réactif du tanin et de l'esculine ne donnent plus de réaction.

Si donc l'esculine a pu être enlevée par les dissolvants dans lesquels elle est insoluble *in vitro*, c'est qu'elle y existe sous une forme autre que celle d'esculine pure. En réalité, ces expériences basées sur la solubilité n'ont qu'une valeur bien relative, car l'on sait combien la présence d'un corps étranger peut influencer la solubilité de certaines substances. Il est possible que l'eau et l'alcool absolu, dans lesquels l'esculine est insoluble, en dissolvent au contraire de grandes quantités lorsque celle-ci est simplement en présence d'un corps étranger. Remarquons d'ailleurs qu'on explique déjà ces solubilités modifiées par la formation de combinaisons peu stables.

Digitized by Google

Seules les expériences chimiques peuvent permettre de résoudre ce problème.

D'après ce que l'on vient d'indiquer, un traitement à l'alcool absolu permettra de dissoudre le contenu des cellules se colorant par la réaction de Sonnenschein. Si ce produit est un mélange d'esculine et d'acide esculitannique, l'acétate de cuivre provoquera la précipitation du tanin et laissera le glucoside intact. Au contraire, les deux corps sont-ils combinés, le sel de cuivre précipitera ce « tanin complexe » et il sera impossible de retrouver de l'esculine dans le filtratum.

On décortique des branches de marronniers de grosseur variant entre 1 et 2 centimètres d'épaisseur et les écorces sont aussitôt plongées dans l'alcool à 95° bouillant. Puis par cinq séries de digestion au bain-marie dans l'alcool à 95°, on dissout les principes qui se trouvent dans ces écorces. A la cinquième digestion la solution alcoolique est encore un peu jaunâtre et donne une faible coloration verte par le perchlorure de fer. Les écorces ainsi traitées soumises à l'action du réactif de Sonnenschein ou des réactifs du tanin ne donnent plus de précipités ou de colorations bien intenses. Les substances donnant les réactions de l'acide esculitannique et de l'esculine sont donc en solution dans l'alcool.

La solution alcoolique est évaporée à siccité au bain-marie dans le vide au moyen d'un appareil spécial (1), de telle façon que la température ne dépasse pas 45 à 50°. Il reste dans le bain-marie un produit grumeleux, verdâtre, devenant sec et cassant par refroidissement. Cet extrait est repris par l'alcool absolu, la solution obtenue est noir verdâtre, et il reste un résidu blanc rosé que l'on sépare par filtration à la trompe.

La solution alcoolique est alors placée dans le vide sulfurique et évaporée à sec. Le produit qui se trouve adhérent au récipient est broyé dans un mortier avec de l'éther absolu qui dissout la chlorophylle. Après trois ou quatre lavages à l'éther il reste un produit bien blanc que l'on jette sur un filtre et l'on continue les lavages à

(1) Cet appareil a été obligeamment mis à notre disposition, dans le laboratoire de M. le professeur Bourquelot, à qui nous sommes heureux d'adresser ici nos plus sincères remerciements.

Digitized by Google

l'éther absolu. Il est indispensable, pour obtenir un produit bien blanc et pulvérulent, de ne traiter le produit brut que lorsque toute l'eau est bien évaporée, et de n'employer que de l'éther absolu. La moindre trace d'eau rend la masse hygroscopique et s'agglomérant avec la plus grande facilité.

Avec cette substance, nous avons fait les deux expériences suivantes :

A. — 3 grammes de ce produit sont mis en solution dans 150 centimètres cubes d'alcool absolu. On ajoute *une solution d'acétate de cuivre dans l'alcool absolu jusqu'à cessation de précipité.* La précipitation complète est longue à obtenir. Après filtration la solution reste claire et ne précipite plus par addition d'acétate de cuivre. L'excès du sel de cuivre est précipité par l'hydrogène sulfuré, on filtre et le dépôt est lavé à l'alcool bouillant de façon à entraîner les traces d'esculine qui auraient pu rester sur le filtre.

La liqueur alcoolique filtrée possède une couleur jaunâtre, elle est évaporée à siccité dans le vide sulfurique. Il reste dans le vase un endroit granuleux dans lequel le microscope ne décèle pas de cristaux. Cet extrait est redissous dans l'alcool à 95°, la solution est filtrée et additionnée d'une petite quantité d'éther de pétrole, il se précipite un produit brunâtre que l'on sépare par filtration ; une nouvelle addition d'éther de pétrole au liquide donne un précipité blanchâtre d'esculine pesant quelques centigrammes seulement.

B. — 3 grammes du produit sont mis en solution dans 250 à 350 centimètres cubes d'eau distillée, et la solution est portée à l'ébullition, à deux reprises différentes, pendant une demi-heure chaque fois. On ajoute une solution aqueuse d'acétate de cuivre jusqu'à cessation de précipité. Le produit est filtré bouillant et le dépôt lavé à l'eau bouillante, à cause de la faible solubilité de l'esculine dans l'eau.

La solution est alors traitée par l'hydrogène sulfuré et filtrée à chaud. Le filtrat est jaune verdâtre très fluorescent ; il est mis à évaporer au 1/3 au bain-marie, puis finalement dans le vide sulfurique. Au bout de quatre à cinq jours, sur les parois du vase se déposent des masses blanc grisâtre et le dépôt augmente peu à peu. On obtient de cette façon environ 30 centigrammes de produit bien cristallisé fondant à 150-153°. La solution mère est remise à évaporer : il se

Digitized by Google

fait une nouvelle cristallisation, que l'on sépare à nouveau ; une troisième séparation après évaporation nous donne encore une petite quantité de cristaux. Le reste de la solution, de poids très faible, gommeux et incristallisable, fut jeté.

Nous avons obtenu 0 gr. 60 de produit cristallisé. Pour le purifier on le dissout dans l'alcool à 95°, et on ajoute de l'éther de pétrole. Il se précipite quelques flocons de résine noirâtre, que l'on sépare par filtration.

La solution filtrée est additionnée d'un grand excès d'éther de pétrole et abandonnée vingt-quatre heures. On recueille ainsi par filtration environ 0 gr. 50 d'esculine pure cristallisée.

Pour conclure : dans l'expérience A, dans laquelle l'eau et la chaleur n'ont joué aucun rôle, il ne se sépare que très peu d'esculine, contrairement à ce que l'on obtient dans l'expérience B.

En A le réactif de Gautier, en précipitant le tanin, a aussi amené la précipitation de l'esculine. Comme cette dernière n'est pas précipitée *in vitro* par l'acétate de cuivre, il est naturel d'admettre que l'esculine et le tanin se trouvent combinés.

Dans l'expérience B l'eau à l'ébullition a dédoublé en partie ou en totalité le principe tannoïde complexe ; le réactif de Gautier a précipité le tanin et laissé intacte l'esculine, que nous retrouvons par la suite.

L'esculine semble donc bien exister dans la plante en combinaison avec le tanin (*esculitannate d'esculine*).

Digitized by Google

CHAPITRE V

LOCALISATION DE L'ESCULINE DANS LE PAVIA RUBRA

Le *Pavia rubra* Mœnch. appartenant à un genre très voisin de l'*Æsculus*, il était intéressant de rechercher par voie microchimique la présence de l'esculine dans cette plante. Nous résumerons brièvement les résultats obtenus par l'étude de la tige et de la feuille.

Tige. — La structure ressemble beaucoup à celle de l'*Æsculus* : on y trouve un épiderme à cuticule assez développée, 3 ou 4 assises de cellules collenchymateuses, un parenchyme cortical assez réduit et un anneau de fibres péricycliques. Le bois est très vasculaire et la moelle très développée.

L'esculine se localise *dans l'épiderme et dans presque toutes les cellules de l'assise collenchymateuse sous-jacente*. Les deux premières assises de collenchyme renferment un pigment donnant à la tige et aux pétioles leur coloration rouge, qui devient bleu verdâtre sous l'action de l'ammoniaque, de sorte que la réaction est peu précise en cet endroit. Les assises de collenchyme plus profondes sont moins riches en esculine que les deux premières. L'esculine se rencontre, en outre, principalement dans l'*endoderme*, la *périphérie de la moelle* et, en petite quantité, dans les parenchymes.

Feuilles. — La structure de la feuille est en tous points semblable à celle de la feuille d'*Æsculus*. Mésophylle bifacial, nervure médiane biconvexe, faisceau libéro-ligneux offrant la même disposition que dans la feuille du Marronnier d'Inde. La seule différence consiste dans la présence chez le *Pavia* de poils unicellulaires assez nombreux à la face inférieure.

La répartition du glucoside dans la nervure médiane se fait comme précédemment : *l'épiderme, les collenchymes sous-épider-*

Digitized by Google

miques, *l'endoderme et la périphérie de la moelle* sont riches en principes actifs ; les parenchymes au contraire en renferment très peu.

Dans le mésophylle la localisation se fait surtout *dans les épidermes*, *avec une réaction plus intense dans l'épiderme supérieur*. On en rencontre aussi dans le parenchyme pallissadique et assez rarement dans le parenchyme lacuneux.

La proportion d'esculine contenue dans le *Pavia* doit être moins forte que celle qui existe dans l'*Æsculus*, si l'on en juge par la quantité de cellules qui donnent la réaction.

Digitized by Google

TROISIÈME PARTIE

RECHERCHES CONCERNANT D'AUTRES GLUCOSIDES

CHAPITRE PREMIER

FUSTINE. — SA LOCALISATION

La fustine est un glucoside que l'on rencontre dans le *Rhus Cotinus* L. ou bois de Fustet. *D'après Schmidt* (1), *elle s'y trouverait combinée à un tanin spécial.*

C'est un corps cristallisant en longues aiguilles blanches, fusible, vers 218°-219°, facilement soluble dans l'eau bouillante, l'alcool et les alcalis dilués, peu soluble dans l'éther.

Elle précipite par l'acétate de plomb le chlorure d'étain, et ces précipités sont solubles dans l'acide acétique.

Par hydrolyse avec un acide dilué, la fustine se dédouble en rhamnose et fisétine.

$$C^{36}H^{26}O^{14} + 4\,H^{2}O = 2\,C^{15}H^{16}O^{6} + C^{6}H^{14}O^{6}$$

La fisétine cristallise en aiguilles jaune citron ; elle est presque insoluble dans l'eau froide, plus soluble dans l'eau chaude, soluble dans l'alcool, l'acétone, l'éther acétique ; elle est peu soluble dans l'éther, la benzine et le chloroforme. L'acide azotique fumant oxyde ce composé, en donnant de l'acide picrique et de l'acide oxalique.

(1) Schmidt, *Ber. d. d. chem. Gessell.*, 1886, p. 17.

Digitized by Google

Par oxydation lente à l'air en solution alcaline, il se forme de l'acide protocatéchique et de la résorcine.

La fisétine réduit la liqueur de Fehling. Sa formule est la suivante :

$$OH - C^6H^3 \begin{cases} O - C - C^6H^3(OH)^2 \\ CO - C - OH \end{cases}$$

ce qui en fait un dérivé de l'isocoumarine.

Réactifs microchimiques de la fustine. — La fustine est un glucoside que l'on ne peut pas se procurer facilement et qui, d'ailleurs, a été peu étudié ; nous ne connaissons aucune réaction caractéristique de ce produit, mais, comme c'est un dérivé de la coumarine, on a essayé la réaction de Sonnenschein.

La fustine traitée par l'acide azotique et l'ammoniaque donne une coloration rouge.

Cette réaction est susceptible d'application microchimique ; car les coupes traitées par le réactif de Sonnenschein pendant trois ou quatre secondes, et plongées ensuite dans l'ammoniaque pour être montées tout aussitôt, donnent une très belle localisation de couleur rouge faible (voir Pl. XII).

Localisation du tanin dans le Rhus Cotinus. — La localisation du tanin a été faite par la méthode habituelle ; en voici brièvement exposés les résultats :

Bichromate de potasse .	1 m. — La localisation est commencée
Acétate d'urane. . . .	5 m. — La localisation est très apparente.
Réactif de Gautier. . .	15 m. — La localisation est terminée.
Molybdate d'ammoniaque	1 m. — Très bonne localisation.
Perchlorure de fer dilué.	24 h. — —
— concentré.	Avec le perchlorure de fer concentré la localisation est instantanée et elle est des plus caractéristiques.
Réactif de Carpene . .	1 m. — Localisation à peine commencée.
— de Bræmer . .	5 m. — Commencement de localisation débutant par la moelle.
Arséniate de soude . .	15 m. — Localisation très apparente, non complète.

Digitized by Google

Eau de chaux	1 h. — Localisation terminée. Résultats excellents.
Eau de baryte	24 h. — Localisation terminée. Résultats excellents.

Le cyanure de potassium est un très mauvais réactif dans ce cas et il faut en rejeter l'emploi.

En résumé, avec la première série de réactifs à bases alcalines, cinq minutes suffisent pour amener la précipitation, et il faut environ quinze minutes pour qu'elle atteigne toute son intensité. Avec la seconde série, il faut un temps plus long pour obtenir une bonne localisation.

Pour les méthodes par osmose, les meilleurs réactifs à employer seront : le bichromate de potasse, le réactif de Gautier et le molybdate d'ammoniaque. C'est ce que nous avons déjà constaté pour le marronnier.

Feuille. — La nervure médiane est biconvexe, avec proéminence plus accentuée à la face inférieure. Les cellules épidermiques ont leurs parois ondulées, particulièrement celles de la face inférieure dont la cuticule est mince. Le collenchyme est très développé au-dessous des épidermes neuraux. Le système libéro-ligneux présente l'aspect d'un U qui serait recouvert à sa partie supérieure d'une lame libero-ligneuse légèrement convexe. Le tissu criblé renferme des canaux sécréteurs très développés, protégés par des amas discontinus de fibres péricycliques.

Le mésophylle possède la structure bifaciale avec un parenchyme palissadique à une rangée de cellules. Les faisceaux des nervures secondaires qui parcourent le parenchyme lacuneux sont très réduits et reliés aux deux épidermes par des cellules parenchymateuses, qui, à la partie supérieure, remplacent le parenchyme palissadique.

De même que pour le Marronnier, les cellules se colorant en rouge par la réaction de Sonnenschein donnent également la réaction des composés tanniques.

Il y a donc aussi une relation étroite entre ces deux corps, fustine et tanin.

La répartition du composé tannoïde complexe est la suivante :

Digitized by Google

Dans le limbe, *l'épiderme supérieur donne une réaction beaucoup plus intense que l'épiderme inférieur*. Le parenchyme palissadique, l'endoderme des faisceaux, quelques rares cellules du mésophylle, sont les lieux d'élection préférés de ce tanin.

Dans la nervure médiane le tanin est en petite quantité dans tous les parenchymes mais particulièrement dans *les épidermes*, *l'endoderme et les cellules péridesmiques avoisinant le bois*.

Contrairement à ce que l'on aurait pu supposer, il n'y a pas de tanin dans les cellules de bordure des canaux sécréteurs ; on ne trouve de cellules tannifères, et en petit nombre, que dans les troisième et quatrième assises (fig. 7 et Pl. XII).

Tige et écorce. — La tige jeune présente la structure suivante : Les cellules épidermiques ont une cuticule peu épaisse et sont dépourvues de poils. L'assise subero-phellodermique prend naissance dans l'assise sous-jacente, le phelloderme est encore peu développé. On ne rencontre pas de cristaux d'oxalate de chaux dans le parenchyme cortical, l'endoderme est assez différencié, et le liber est remarquable par les volumineux canaux sécréteurs qu'il renferme ; il est protégé par des amas de fibres péricycliques, situées principalement au-dessus des canaux et formant un anneau discontinu. Le bois est constitué par de nombreuses fibres et quelques gros vaisseaux. La moelle, très développée, est formée de cellules polygonales très irrégulières. Le liber et le bois sont sillonnés par des rayons médullaires à 1-2 rangées de cellules.

Dans une tige âgée, le liège et le phelloderme sont beaucoup plus développés. Une nouvelle série de canaux sécréteurs apparaît dans le liber secondaire au voisinage du cambium.

Le composé tannique est comme toujours *absent dans le liège* ; il se répartit surtout dans les premières *assises du phelloderme*, *dans l'endoderme*, *les rayons médullaires* et aussi *le parenchyme libérien*. Dans la moelle on distingue de nombreuses cellules, plus petites que les cellules du parenchyme environnant et, par suite, ressemblant aux cellules à tanin des Rosacées. En coupe longitudinale ces cellules sont superposées les unes au-dessus des autres formant une file assez longue d'éléments tannifères. *Au pourtour des faisceaux*, *il existe une ligne continue de cellules qui don-*

Digitized by Google

nent la réaction et séparent, pour ainsi dire, la moelle des faisceaux ligneux.

La fustine existe dans la plante à l'état de combinaison avec un tanin spécial.

Ce composé se rencontre principalement dans *l'épiderme, l'endoderme et la périphérie* de la moelle, et en petite quantité dans les parenchymes. Les cellules sécrétrices voisines de la cavité des canaux sécréteurs ne renferment pas ce composé tannique.

Nos résultats viennent donc confirmer l'opinion émise précédemment par Schmidt.

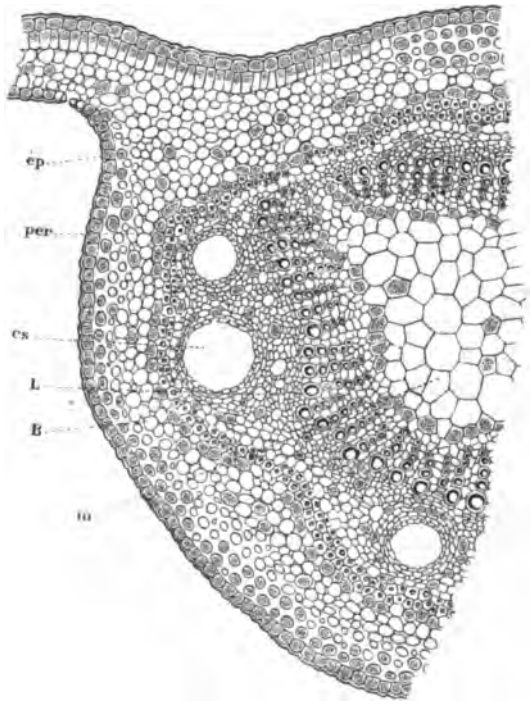


Fig. 7

Fig. 7. — Localisation de la fustine dans la feuille de *Rhus Cotinus* L.

Digitized by Google

CHAPITRE II

FRAXINE. — SA LOCALISATION

La fraxine est un glucoside non azoté que l'on retire de l'écorce du *Fraxinus excelsior* L. et d'autres *Frdxinus*. On la rencontrerait en petite quantité dans l'écorce de l'*Æsculus Hippocastanum* L. et du *Pavia rubra* Mœnch. Sa formule est :

$$C^{16}H^{18}O^{10}.$$

C'est une poudre incolore ou légèrement colorée en jaune, cristallisant, hydratée et sous forme d'aiguilles. Elle est peu soluble dans l'eau et l'alcool froid, mais beaucoup plus soluble à chaud.

Les solutions alcooliques ou aqueuses présentent une fluorescence bleue très pâle, que les alcalis augmentent et que les acides font disparaître ; le charbon animal enlève la fraxine à ses solutions.

Elle fond vers 300° ; si l'on élève brusquement la température, elle fond en se détruisant, mais il se sublime une petite quantité d'un produit cristallisé, dont la solution aqueuse possède une fluorescence bleue et prend une teinte jaune par addition d'ammoniaque.

Les réactions particulières de la fraxine sont les suivantes :

1° En présence d'un alcali la fraxine donne une coloration jaune soufre ;

2° L'acétate de plomb ammoniacal y produit un précipité jaunâtre ;

3° Le sesquichlorure de fer colore en vert la solution aqueuse de fraxine et y fait naître peu à peu un précipité jaunâtre.

Par ébullition avec les acides, la fraxine se dédouble en glucose

Digitized by Google

et en un corps cristallisé que SALM-HORSTMANN a appelé fraxétine.

D'après ROCHELEDER, rejetant l'ancienne formule de la fraxine

$$C^{21}H^{12}O^{13},$$

le dédoublement s'opère de la façon suivante :

$$C^{16}H^{18}O^{10} + H^2O = C^6H^{12}O^6 + C^{10}H^8O^5.$$

La fraxétine, produit de dédoublement de la fraxine, est un corps cristallisé peu soluble dans l'eau, un peu plus soluble dans l'alcool, soluble dans l'éther et l'acide chlorhydrique. Sa composition est actuellement bien connue par les travaux de KŒRNER et BIGINELLI ; elle se rapproche beaucoup de la daphnétine et de l'esculine, dont elle ne différerait que par un groupe méthoxyle. Sa constitution serait alors représentée par la formule suivante :

$$C^6H \begin{cases} -CH = CH \\ -O - CO \\ -OCH^3 \\ -OH \\ -OH \end{cases}$$

la position respective des oxhydriles restant indéterminée.

Réactifs microchimiques. — Nous avons essayé les réactions que donne la fraxine ; elles sont peu nombreuses et peu susceptibles d'application aux recherches microchimiques. Citons cependant quelques-unes d'entre elles :

1° Si dans un verre de montre, où l'on a mis 2 à 4 gouttes de liqueur de Labarraque et 1 goutte d'acide chlorhydrique, on ajoute un peu de fraxine, on obtient une coloration rose ; l'esculine donne la même réaction ;

2° L'acide sulfurique à 66° produit une coloration jaunâtre ;

3° L'acide sulfurique hydraté additionné de séléniate de soude ne donne aucune réaction, comme l'esculine d'ailleurs ;

4° Le réactif de Mandelin donne une coloration rose fugace. L'esculine agit de même ;

5° La constitution de la fraxine se rapprochant de celle de l'esculine, il était logique d'essayer la réaction de Sonnenschein, si pratique pour l'esculine. Elle réussit également bien pour la fraxine.

Des cristaux de fraxine touchés avec une goutte d'acide azotique

Digitized by Google

pur prennent une coloration brunâtre, que l'addition d'ammoniaque fait passer au rouge marron. La réaction *in vitro* se fait beaucoup mieux avec l'acide azotique pur, car elle n'est pas masquée par le précipité d'hydrate de fer qui se forme avec le réactif de Sonnenschein. Au contraire, sur les coupes ce réactif agit beaucoup mieux.

Après avoir essayé les acides de diverses concentrations, nous croyons devoir recommander la solution renfermant : acide azotique, 2 parties ; eau, 1 partie.

$$\text{Avec les solutions } \frac{\text{Acide azotique}}{\text{Eau}} \quad \frac{1}{1}, \frac{2}{3}, \frac{1}{2}$$

la réaction est de moins en moins précise. Avec la solution à parties égales, la coloration rouge obtenue est déjà bien faible ; avec l'acide étendu 2/3, on n'obtient plus guère qu'une teinte de couleur bois. L'acide azotique 1/2 n'agit plus sur la fraxine, et l'addition ultérieure d'ammoniaque y produit une coloration jaune, puis une fluorescence bleue.

L'esculine traitée dans les mêmes conditions donne une coloration identique, mais beaucoup plus rouge, qui ne se produit plus avec des acides de concentration trop faible. La réaction exige pour être encore suffisamment nette une dilution à parties égales.

La daphnine, isomère de l'esculine, traitée dans des conditions identiques, ne donne, comme on le verra plus loin, aucune coloration.

Localisation de la fraxine. — Pour la localisation de la fraxine, nous conseillons : A, *la réaction de Sonnenschein*, B, *l'action des alcalis sur ce glucoside.*

A. — Pour exécuter la réaction de Sonnenschein, les coupes sont plongées dans le réactif : acide azotique ferrugineux, 2 parties ; eau, 1 partie, et abandonnées de 2 à 4 secondes (2 suffisent généralement). On les porte aussitôt après dans l'ammoniaque un peu dilué (ammoniaque, 2 parties ; eau, 1 partie). La coupe prend rapidement une teinte violacée, on la retire aussitôt, on la lave dans l'eau et on la monte dans la glycérine ; la réaction est beaucoup plus délicate à effectuer que celle de l'esculine. Il y a souvent une

Digitized by Google

grande diffusion de la teinte, de sorte que toute la coupe, sauf le bois et le péricycle sclérifié, prend une teinte rose uniforme. Cet inconvénient provient de ce que la fraxine est soluble dans l'acide azotique et l'ammoniaque ; aussi deux secondes de contact dans le réactif de Sonnenschein sont-elles suffisantes. Il est de même nécessaire de retirer la coupe de l'ammoniaque dès que la coloration violette commence à apparaître. Le temps nécessaire au transport des coupes de l'ammoniaque dans l'eau de lavage suffit pour terminer la réaction. Ce petit artifice permet alors de se servir utilement de ce réactif.

Le phénomène de diffusion qui pourrait induire en erreur un observateur non habitué à ces recherches microchimiques, peut facilement être mis en évidence de la façon suivante. La coupe est plongée une seconde dans le réactif de Sonnenschein et placée ensuite sur une lame porte-objet. On dispose près de la lamelle recouvrant la préparation une goutte d'ammoniaque, qui par capillarité arrive bientôt au contact de la coupe.

Les cellules à glucoside se colorent d'abord seules, puis la teinte diffusant peu à peu, toute la préparation ne tarde pas à prendre une coloration rose uniforme.

B. — Pour localiser la fraxine au moyen des alcalis, nous employons :

1° Une solution de potasse à 2 p. 100 (une solution à 1 p. 100 n'est pas suffisamment concentrée, et à 4 p. 100 la concentration est trop forte) ;

2° Une solution d'ammoniaque à parties égales avec l'eau ou la glycérine, l'ammoniaque concentrée ayant l'inconvénient de la potasse à 4 p. 100 ;

3° L'eau de chaux est dans ce cas un excellent réactif, le meilleur à notre avis.

Les coupes sont plongées dans l'un ou l'autre de ces réactifs et y seront abandonnées une ou deux secondes, sauf dans le cas de l'eau de chaux où l'on peut les laisser jusqu'à trente secondes ; on les retire et on monte aussitôt dans la glycérine.

Cette méthode est préférable à la précédente et les cellules à glucoside sont faciles à distinguer, grâce à la coloration jaune qu'elles prennent dans ces conditions.

Digitized by Google

Localisation du tanin dans l'écorce du Fraxinus excelsior L.

Nous avons d'abord essayé les réactifs du tanin sur la fraxine et sur le tanin du frêne que nous avons préparé à cet effet.

Le tableau comparatif ci-dessous expose nos recherches :

RÉACTIF	EFFETS SUR LE TANIN DU FRÊNE	EFFETS SUR LA FRAXINE
Sulfate ferreux..... .	Précipité noir verdâtre.	
Réactif de Carpene.....	Précipité.	Coloration jaune ; en solution augmente la fluorescence.
Réactif de Bræmer.....	»	id.
Bichromate de potasse...	Précipité.	Rien.
Molybdate d'amoniaque..	»	Rien.
Acétate d'urane.....	Précipité.	Coloration faiblement rosée.
Perchlorure de fer.....	Précipité noir verdâtre.	Teinte légèrement verdâtre.
Réactif de Gautier.....	Précipité noirâtre.	Rien.
Arséniate de soude.....	»	Coloration jaune ; en solution augmente la fluorescence.
Cyanure de potassium...	»	id.
Eau de baryte.....	»	id.
Eau de chaux.....	»	id.

La technique est la même que pour la localisation de l'acide esculitannique. Nous avons employé la méthode par osmose et par contact direct des coupes avec les réactifs. Pour les résultats obtenus, nous renvoyons au tableau qui concerne ce tanin (p. 72-75).

En général, avec les réactifs fortement alcalins comme le réactif de Carpene, l'eau de baryte, l'eau de chaux, le cyanure de potassium, la réaction se fait plus rapidement que pour le Marronnier ; aussi les préparations ne doivent-elles rester dans ces réactifs que quelques secondes, au maximum une minute. Si l'on dépasse ce temps de contact, il y a dédoublement probable du produit, car celui-ci se dissout, et la localisation disparaît.

Digitized by Google

Le réactif de Bræmer, l'arséniate de soude, qui sont moins alcalins, fournissent une réaction identique mais plus longue à se produire. L'emploi de ces réactifs n'est pas à préconiser.

Il en est de même du molybdate d'ammoniaque et du sulfate de fer. Nous donnons la préférence au bichromate de potasse ainsi qu'au réactif de Gautier. Il faut laisser les préparations dans les solutions au moins pendant 15 à 20 minutes pour que la réaction atteigne toute son intensité.

Quant à la méthode osmotique, nous recommandons également comme excellents réactifs le bichromate de potasse et l'acétate de cuivre (réactif de Gautier).

Le perchlorure de fer et l'acétate d'urane donnent également de bons résultats mais qui ne sont pas à comparer avec ceux obtenus avec les réactifs précédents.

Les cellules donnant les réactions de la fraxine donnent également des réactions positives avec les réactifs des tanins. Ce glucoside semble aussi exister à l'état de combinaison avec le tanin.

Ainsi qu'on peut le voir, les localisations de la fraxine et du tannin de l'écorce de frêne sont beaucoup plus délicates à réaliser que celles de l'esculine et de l'acide esculitannique. Il faut avoir grand soin de faire des coupes un peu épaisses et de les laisser le temps indiqué dans le réactif pour obtenir de bonnes préparations. D'ailleurs, dans ce cas, il n'y a pas de règles fixes ; il faut procéder par tâtonnements à l'aide des indications précédentes.

Répartition des cellules à glucoside et à tanin dans une écorce de Fraxinus excelsior. — Examinons maintenant quelle est la répartition des cellules à tanno-glucoside dans une tige de deux ans, dont la structure histologique est la suivante :

Un épiderme, puis un suber formé de 3 à 4 assises de cellules de liège, allongées dans le sens radial et dont les parois sont fortement ondulées. Le phelloderme est constitué par des cellules très collenchymateuses et le parenchyme cortical formé de cellules allongées tangentiellement, fortement serrées les unes contre les autres et par suite présentant des méats excessivement réduits.

Le cylindre central débute par un anneau péricyclique fibro-sclérreux continu, composé de paquets de fibres réunis entre eux par de grands éléments sclérifiés. Le liber parenchymateux, à éléments

Digitized by Google

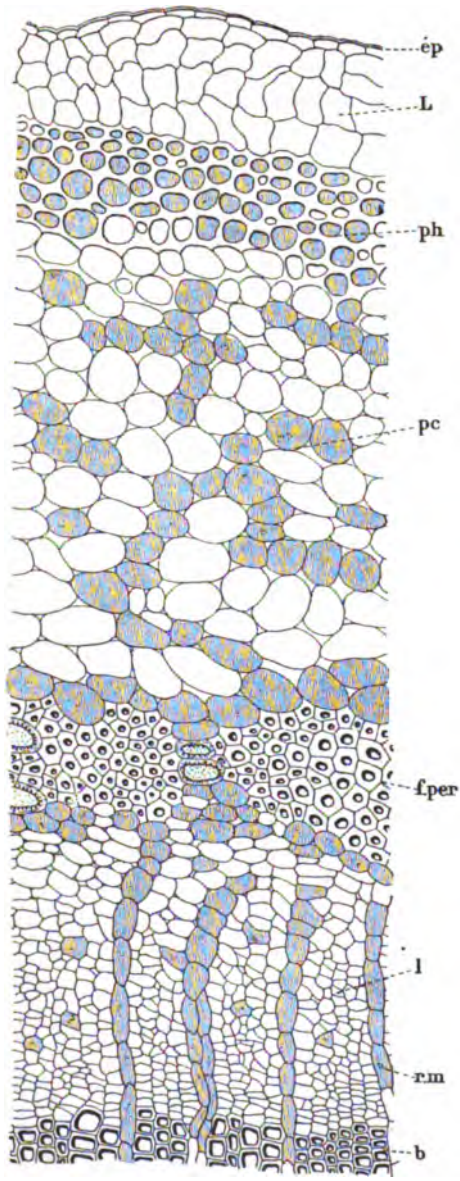


Fig. 8. — Localisation de la fraxine dans l'écorce du *Fraxinus excelsior* L.

***ep.*, épiderme ; — *L.*, liège ; — *ph.*, phelloderme ; — *pc.*, parenchyme cortical ; *f.per.*, fibres pericycliques ; — *l.*, liber ; — *r.m.*, rayons médullaires ; — *b.*, bois.**

Digitized by Google

irréguliers disposés en série radiale, est parcouru par des rayons médullaires de 1 à 2 rangées de cellules. Le bois, peu vasculaire, est presque entièrement fibreux dans sa partie externe.

La fraxine et le tanin sont répartis en grande abondance dans le *phelloderme, l'endoderme* et dans *les cellules de la périphérie de la moelle au voisinage du bois.* Le parenchyme libérien, les rayons médullaires donnent une réaction peu intense ; le parenchyme cortical, contrairement à ce que l'on trouve chez le marronnier, est assez riche en cellules à glucoside. Toutes les cellules situées immédiatement au-dessous de l'anneau fibreux péricyclique donnent la réaction, formant ainsi une ligne colorée qui, avec celle donnée par l'endoderme, encadre pour ainsi dire l'anneau scléreux.

Le suber ne renferme ni fraxine ni tanin. Toutefois, l'assise épidermique ne se colore pas par les réactifs de la fraxine, tandis qu'au contraire les réactifs du tanin y donnent des précipités très nets.

Mais ce produit tannifère semble être différent de celui contenu dans les cellules à fraxine, car le précipité obtenu, par les réactifs alcalins, dans les cellules épidermiques ne disparaît pas par un contact prolongé avec le réactif. Dans les mêmes conditions, le tanin contenu dans les cellules à fraxine est rapidement dissous. C'est là un fait curieux, sur lequel nous nous proposons de revenir à une époque de végétation plus propice.

Digitized by Google

CHAPITRE III

DAPHNINE. — SA LOCALISATION

La daphnine est un isomère de l'esculine que l'on retire du *Daphne alpina* L., du *Daphne gnidium* L. C'est un glucoside qui cristallise en prismes rectangulaires avec deux molécules d'eau de cristallisation qu'il perd à 100° ; il fond à 200°.

Par ébullition avec les acides dilués ou les alcalis, la daphnine se dédouble et donne du glucose et de la daphnétine.

La formule est la suivante :

$$C^6H^2 \begin{cases} \diagup CH = CH \\ \qquad\qquad | \\ -O - CO \\ -OH \\ \diagdown OC^6H^{11}O^5. \end{cases}$$

Les réactions colorées de ce corps sont peu nombreuses et on ne connaît guère que l'action des alcalis, qui donne une coloration jaune soufre avec les cristaux de daphnine, et la coloration rouge que lui communique l'acide azotique.

Nous avons essayé la réaction de Sonnenschein qui nous a si bien réussi avec l'esculine, on n'obtient dans ces conditions qu'un résultat négatif.

Localisation. — La répartition de la daphnine a déjà été étudiée par L. Sauvan dans les divers organes du *Daphne alpina* L. et du *D. gnidium*. Il emploie à cet effet : 1° une solution de potasse ; 2° l'acide nitrique concentré, qui donne une coloration jaune orange ou rouge sang, selon la proportion du glucoside. Nous avons repris l'étude de cette localisation à notre point de vue spécial dans les tiges et les feuilles de ces deux plantes.

Digitized by Google

La solution de potasse doit être assez concentrée, et nous nous sommes arrêté aux proportions suivantes : potasse, 5 grammes ; eau, 50 centimètres cubes.

Les coupes sont déposées sur la lame et recouvertes d'une lamelle, puis on place près de cette dernière une solution de potasse qui, en arrivant au contact des cellules à daphnine, les colore en jaune soufre. Il faut suivre la réaction sous le microscope, car la diffusion est assez rapide et on ne peut plus affirmer dans quelles cellules a pris naissance la coloration. Une solution de potasse plus faible, solution à 4 p. 100, donne aussi de bons résultats pour les assises du phelloderme, mais la coloration obtenue est trop faible dans les cellules du liber et des rayons médullaires.

L'acide azotique concentré, qui donne une belle réaction *in vitro*, ne nous a donné aucun résultat en histochimie. Peut-être devons-nous attribuer cet échec à la faible teneur en daphnine de nos échantillons.

Répartition de la Daphnine dans le Daphne alpina L.

Tige. — En coupe transversale, on voit extérieurement un suber de plusieurs rangées de cellules isodiamétriques, à parois minces, puis une région phellodermique de 4-6 rangées de cellules collenchymateuses allongées tangentiellement.

Le parenchyme cortical est formé de cellules ovoïdes ou arrondies laissant entre elles de larges méats. La région péricyclique est pourvue de nombreux amas de fibres, à lumen assez développé, qui protègent les coins libériens. Le tissu criblé est relativement peu développé ; il renferme de nombreuses fibres libériennes disposées sans ordre apparent par paquet de trois ou quatre de ces éléments. Le bois, très peu vasculaire, forme un anneau complet qui, à l'exception de quelques trachées, est exclusivement composé de fibres. Les rayons médullaires sont à une seule cellule, à parois épaisses et ponctuées. La moelle est assez développée et présente à la périphérie de nombreux îlots de tissu criblé périmédullaire avec quelques fibres vers la partie la plus intense. Jamais de cristaux.

La daphnine existe : dans les deux premières rangées de cellules phellodermiques, qui prennent une coloration jaune intense

Digitized by Google

dans quelques cellules du parenchyme cortical et en particulier, au voisinage du phelloderme, dans les rayons médullaires libériens et quelques rares cellules du parenchyme libérien au voisinage des fibres. Enfin, dans la zone médullaire, elle se trouve presque exclusivement au contact des îlots de tissu criblé périmédullaire.

Feuille. — La nervure médiane proéminente, à la face inférieure seulement, comprend un arc vasculaire peu développé protégé par du collenchyme sous-épidermique. Le mésophylle du limbe est bifacial avec deux rangées de cellules palissadiques et un tissu très lacuneux. Les épidermes glabres sont fortement cutinisés et à larges éléments.

Dans le limbe la daphnine se localise :

1° *Dans toutes les cellules de l'épiderme supérieur ;* 2° *dans les cellules de l'épiderme inférieur, principalement au-dessus de la nervure principale, mais toujours en moins grande quantité que dans l'épiderme supérieur*, fait déjà signalé pour l'esculine. Ajoutons que l'on obtient une réaction faible dans le tissu palissadique et le tissu lacuneux.

Dans la nervure médiane nous pouvons signaler comme donnant une réaction caractéristique, les *épidermes*, *l'endoderme*, les *rayons médullaires* et les *cellules de la région péridesmique*. Quelques cellules du parenchyme et du liber se colorent très faiblement en jaune.

En cherchant à nous assurer comme précédemment de la présence simultanée du tanin et du glucoside dans les mêmes éléments cellulaires, nous avons constaté avec étonnement que cette plante ne renfermait pas, ou du moins contenait une quantité insignifiante de tanin. Le tableau suivant résume les résultats de nos expériences :

Réactif de Gautier.	Après 48 heures : *Écorce.* — Les deux premières assises du phelloderme prennent une coloration un peu plus accentuée que les autres. Mais pas de précipité. *Feuille.* — Cellules épidermiques, coloration un peu plus accentuée.

Digitized by Google

Perchlorure de fer.	Après 1 heure : *Écorce.* — Quelques cellules faiblement brunâtres dans les deux premières assises phellodermiques. *Feuille.* — Quelques cellules épidermiques se colorent en brun.
Acétate d'urane.	Après 48 heures : *Écorce.* — Les deux premières assises du phelloderme prennent une coloration jaune orange très faible. *Feuille.* — Coloration orangée dans quelques cellules épidermiques de la feuille.
Molybdate d'ammoniaque.	Après 48 heures : Rien dans l'écorce ni dans la feuille.
Bichromate de potasse.	Coloration un peu plus foncée dans les deux premières assises phellodermiques et dans l'épiderme des feuilles.

Ainsi qu'on peut le voir, ces réactions sont bien différentes de celles obtenues avec tant de netteté chez l'*Æsculus* et les autres plantes, et ne sont pas assez caractéristiques pour affirmer la présence du tanin dans les mêmes éléments que la daphnine. *Aussi nous croyons que si cette dernière n'existe pas à l'état libre dans la plante, elle est combinée avec un composé ne fournissant pas les réactions du tanin.*

Digitized by Google

CHAPITRE IV

SALICINE. — SA LOCALISATION

La salicine est un glucoside que l'on retire de l'écorce de plus sieurs espèces de saules et de peupliers.

S. alba L. *S. purpurea* L., *S. helix* L., *S. incana* L., *S. præcox*- L., *S. hastata* L., *S. pentandra* L., *S. polyandra* L., *Populus alba* L., *P. tremula* L., etc.

Au contraire elle n'existe pas dans les espèces suivantes :

S. vitellina L., *S. caprea* L., *S. viminalis* L., *S. bicolor* L., *Populus nigra*, *P. angulosa*, *P. balsamea*, etc.

Ce corps cristallise en aiguilles blanches prismatiques appartenant au système orthorhombique. Il est dextrogyre, soluble dans l'eau froide (5 à 6 p. 100), très soluble dans l'eau chaude. La salicine est aussi soluble dans l'alcool, mais insoluble dans l'éther de pétrole, la benzine. Elle fond à 200°, et à une température plus élevée elle se décompose en donnant de l'aldéhyde salicylique et un mélange de produits empyreumatiques. Elle ne précipite pas les acétates neutre ou basique de plomb, mais précipite par l'acétate de plomb ammoniacal.

Chauffée doucement avec un acide étendu, la salicine se dédouble en saligénine et glucose.

$$C^6H^{11}O^5 - O - C^6H^4 - CH^2OH + H^2O = C^6H^{12}O^6 + C^6H^4 < \begin{matrix} CH^2OH \\ OH \end{matrix}$$

A l'ébullition, au lieu d'obtenir la saligénine, on obtient un produit de déshydratation, la salirétine.

L'émulsine produit également le dédoublement en glucose et saligénine, mais ne donne jamais de salirétine.

Par oxydation ménagée, la salicine, qui est un glucoside à fonction alcool, se change en un glucoside à fonction aldéhyde. C'est

Digitized by Google

ainsi que par oxydation ménagée on obtient l'hélicine. Si l'oxydation est plus complète, si l'on chauffe avec un mélange de bichromate de potasse et d'acide sulfurique, par exemple, on obtiendra de l'acide salicylique, de l'acide formique et du gaz carbonique. Avec l'acide concentré elle donne de l'acide nitro-salicylique et de l'acide oxalique.

La salicine n'est pas attaquée à l'ébullition par les solutions alcalines, mais, fondue avec un excès de potasse, elle donne du salicylate et de l'oxalate de potassium. Distillée avec la chaux vive, on obtient du phénol et de l'aldéhyde salicylique.

C'est surtout aux travaux de Piria (1) que l'on doit la connaissance de la constitution de la salicine. Sa formule est la suivante :

$$C^6H^4 \begin{cases} O - C^6H^{11}O^5 \ (1) \\ CH^2OH \ (2) \end{cases}$$

Celles de la saligénine et de l'hélicine sont :

$$C^6H^4 \begin{cases} OH \ (1) \\ CH^2OH \ (2) \end{cases} \qquad C^6H^4 \begin{cases} O.C^6H^{11}O^5 \ (1) \\ CHO \ (2). \end{cases}$$

L'action du chlorure de benzoyle sur la salicine a donné à Schiff un dérivé monobenzoylé dans lequel le radical benzoyle aurait éthérifié une des fonctions alcool. Cette benzoylsalicine est identique avec un produit retiré des feuilles et de l'écorce du peuplier-tremble, la *populine*. Ce serait le composé

$$C^6H^4 \begin{cases} OC^6H^{11}O^5 \\ CH^2 - O - CO - C^6H^5. \end{cases}$$

Réactions de coloration. — Toutes ces décompositions et réactions ne peuvent être utilisées en microchimie ; une seule d'entre elles est susceptible d'application, c'est la coloration rouge sang que communique à la salicine l'acide sulfurique concentré. Ajoutons que cette coloration disparaît par addition d'eau et que, si l'on chauffe le mélange, il se forme une matière résinoïde dont nous avons déjà parlé, la salirétine.

Les acides hydratés ne donnent pas cette réaction.

(1) Piria, *Ann. de Chim. et Phys.*, 2e sér., t. LXIX, p. 281-326, 1838, et 3e sér., t. XIV, p. 257-301, 1845.

Digitized by Google

Localisation de la salicine. — L'emploi de l'acide sulfurique est très délicat, les préparations mises en présence de ce réactif sont immédiatement détruites et il est impossible de les transporter sous le microscope. On devra donc examiner les coupes directement dans une goutte de réactif. Malgré ces précautions, on n'obtient que des résultats médiocres; quant à obtenir une localisation nette, c'est inutile d'y songer.

L'acide sulfurique dilué ne donne aucune réaction avec la salicine, mais il n'en est pas de même si l'on y ajoute du séléniate de soude en cristaux. Au contact de ce dernier, il se développe une coloration rouge, qui va sans cesse en augmentant et met dix à quinze minutes pour atteindre son maximum d'intensité.

Cette réaction peut être employée à la recherche de la salicine en prenant les précautions suivantes : 2 grammes de séléniate de soude sont réduits en poudre fine et mélangés avec 2 centimètres cubes d'acide sulfurique hydraté. On obtient de la sorte une bouillie que l'on conserve dans un flacon bien bouché, afin d'éviter l'absorption de l'eau, car, trop hydraté, le réactif serait inutilisable. Au moment de l'employer, après avoir bien mélangé le tout, on porte 5 à 6 gouttes de cette bouillie dans un verre de montre et on y abandonne les coupes pendant cinq à dix minutes. Après cinq minutes de contact, la réaction est déjà bien commencée, mais elle n'est généralement complète que vers la septième et la huitième minutes. On est d'ailleurs guidé par la coloration rosée que prend la préparation. Les coupes sont alors retirées du réactif et portées dans un verre de montre renfermant de la glycérine pure. Les cristaux de séléniate, en raison de leur densité plus élevée, se séparent, et la coupe, débarrassée de la bouillie de cristaux qui l'entourait, surnage dans le liquide ; on la monte alors dans une goutte de glycérine.

On obtient ainsi une très belle localisation, mais cette manipulation est délicate et il est nécessaire de recommencer un certain nombre de fois pour arriver à posséder une excellente préparation. Ce traitement par l'acide sulfurique a l'inconvénient d'endommager les tissus, aussi n'est-il pas rare que les préparations se détruisent pendant le lavage dans la glycérine. Il faut donc avoir grand soin de ne pas prolonger le contact des coupes avec l'acide. Ajoutons que l'eau ne peut pas être employée pour laver les coupes

Digitized by Google

au sortir du réactif, car le dégagement de chaleur qui résulte de sa combinaison avec l'acide désagrège toujours les tissus. Il est indispensable d'apporter un soin minutieux à toutes ces manipulations, mais avec un peu d'expérience on arrive cependant à un bon résultat.

Par ce traitement toutes les membranes des fibres péricycliques et libériennes prennent une teinte rose, puis rouge ; cette coloration pourrait faire admettre la présence de salicine dans ces fibres.

Il faut rejeter cette hypothèse, car le même fait se reproduit avec le *Salix viminalis* L. qui ne renferme pas de salicine. Cette coloration rouge des fibres du *S. alba* et du *S. viminalis* se produit d'ailleurs avec l'acide sulfurique hydraté, qui n'a pas d'action de ce genre sur la salicine.

Si l'on fait agir l'acide sulfurique additionné de séléniate de soude sur un saule sans salicine, le *Salix viminalis* L., par exemple, au bout de trente secondes la coupe a déjà pris une teinte jaunâtre et les cellules correspondantes à celles qui renferment la salicine chez le *Salix alba* L. ont une coloration jaune bois bien différente de la teinte rougeâtre observée avec ce saule à salicine.

La même réaction se produit, d'ailleurs, également dans les mêmes cellules avec l'acide sulfurique hydraté.

L'action lente identique à celle produite *in vitro*, la coloration jaune rouge qu'il donne avec les saules à salicine, la réaction si différente des saules sans salicine, prouvent bien que notre réactif excellent pour la localisation de ce glucoside.

Localisation de l'acide salicitannique. — Répétant toujours les mêmes expériences que précédemment, il nous suffit de dire que la préférence doit être accordée au bichromate de potasse, au molybdate d'ammoniaque, à l'acétate d'urane ou bien au réactif de Gautier. La localisation de ce tanin est très facile.

Bichromate de potasse. — Molybdate d'ammoniaque.	Après 1 m.	— La localisation est bien délimitée.
	— 5 m.	— Localisation très nette, presque terminée.
	— 15 m.	— Localisation terminée.
	— 3 h.	— Très belle localisation.
	— 24 h.	— —

Digitized by Google

Acétate d'urane. **Réactif de Bræmer.** **Réactif de Carpene.**	Après 1 m. — Quelques rares cellules sont colorées. — 5 m. — La localisation s'accuse. — 15 m. — Localisation presque terminée, n'a pas encore atteint toute son intensité. — 3 h. — Très bonne localisation. — 24 h. — —
Réactif de Gautier.	Après 1 m. — Quelques cellules ont déjà donné la réaction. — 5 m. — Localisation bien accusée. — 15 m. — Localisation terminée. N'a pas encore atteint toute son intensité. — 3 h. — Très bonne localisation. — 24 h. — —
Perchlorure de fer.	**Concentré.** — La localisation est instantanée et très nette. Après 1 m. — Localisation bien délimitée. **Dilué.** — 5 m. — Localisation terminée. Elle est moins caractéristique qu'avec les autres réactifs. Il est préférable d'employer le perchlorure de fer concentré.
Sulfate de fer.	Après 1 m. — Coloration verte de toute la coupe et commencement de localisation. — 5 m. — Localisation terminée. — 15 m. — — La localisation par le sulfate de fer n'est pas aussi caractéristique qu'avec les autres réactifs.
Arséniate de soude.	Après 1 m. — Rien. — 5 m. — Commencement de réaction. — 15 m. — Localisation bien accusée. — 3 h. — Localisation terminée. — 24 h. — Bonne localisation.

Digitized by Google

Cyanure de potassium.	Après 1 m. — Rien. — 5 m. — La localisation commence à s'accuser. — 3 h. — Mauvaise localisation. — 24 h. — Mauvaise localisation. Ce réactif ne donne pas de bons résultats.
Eau de chaux. — Eau de baryte.	Après 1 m. — Localisation dans quelques cellules. — 5 m. — Localisation bien accusée — 15 m. — Localisation terminée. — 3 h. — Bonne localisation. — 24 h. — —

Comme on le voit par ce tableau, le temps de contact varie avec chaque réactif. Il faut cinq minutes avec les réactifs tels que l'urane, le bichromate, le molybdate, le réactif de Gautier et quinze minutes pour que la coloration atteigne son maximum d'intensité. Avec les réactifs de Brœmer, de Carpene, l'arséniate de soude, l'eau de chaux, l'eau de baryte, il faut quinze minutes pour avoir une bonne localisation et près d'une heure pour que cette dernière ait atteint son maximum d'intensité.

La localisation par osmose est également excellente, préférable même à la précédente. Elle réussit admirablement avec le bichromate de potasse, le réactif de Gautier et le molybdate d'ammoniaque. Le temps de la précipitation varie avec la longueur de l'échantillon.

Répartition de la salicine et du tanin dans les différents organes du Salix alba L.

1° **Feuille.** — La nervure médiane est biconvexe. Les cellules épidermiques sont fortement cutinisées et présentent des poils unicellulaires nombreux. On trouve en dessous de l'épiderme inférieur du tissu collenchymateux très développé. Le parenchyme renferme de nombreux cristaux d'oxalate de chaux, en macles et rhom-

Digitized by Google

boèdres, principalement situés vers l'endoderme. Le tissu criblé est protégé par des îlots péricycliques fibreux. Le système conducteur se compose de deux faisceaux libéro-ligneux dont l'un est disposé en arc. Le bois est fortement vasculaire avec du parenchyme

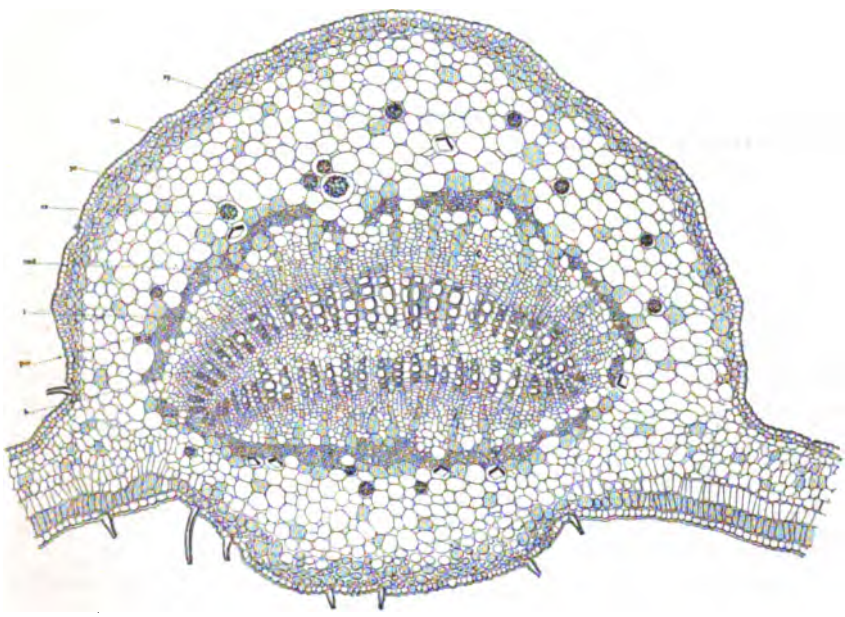


FIG. 9. — Localisation de la salicine dans la feuille de *Salix alba* L.
ep., épiderme ; — *col.*, collenchyme ; — *pc.*, parenchyme cortical ; — *end.*, endoderme ; *cr.*, cristaux d'oxalate de chaux ; — *l.*, liber ; — *per.*, péricycle ; — *b.*, bois.

peu lignifié et est traversé par des rayons médullaires à une seule rangée de cellules.

Le mésophylle est bifacial, mais les cellules ont une tendance à s'orienter perpendiculairement aux épidermes, de façon à simuler un tissu palissadique homogène. Sous l'épiderme inférieur, signalons une assise hypodermique qui sépare le tissu palissadique de l'épiderme. Dans ce mésophylle on rencontre çà et là de grosses cellules sphériques remplies par une macle volumineuse d'oxalate de chaux (fig. 9).

La salicine et l'acide salicitannique se localisent dans les mêmes

Digitized by Google

cellules. Dans la nervure médiane on les rencontre principalement dans *les assises collenchymateuses sous-épidermiques*, avec *une réaction plus intense à la partie supérieure de la feuille, dans l'endoderme*, les *rayons médullaires et la périphérie de la moelle.* On en rencontre très peu dans le parenchyme de la nervure et les épidermes. Le liber et le parenchyme ligneux en sont presque totalement dépourvus.

Dans le limbe, les épidermes présentent une réaction négative. C'est un fait assez curieux, mais qui n'est pas spécial au *Salix alba*, car il a été déjà signalé également chez les *Cinchona*. La salicine et le tanin se localisent alors dans *l'hypoderme de la face inférieure, dans le tissu palissadique de la face supérieure et dans quelques cellules du mésophylle, au voisinage des faisceaux des nervures secondaires* (fig. 9).

2° **Tige jeune.** — La structure anatomique de la tige jeune est la suivante :

Sous un épiderme à cuticule fortement développée nous trouvons un tissu collenchymateux comprenant 3-4 assises de cellules, puis un parenchyme cortical relativement peu développé avec de nombreuses macles d'oxalate de calcium. L'endoderme est peu visible. Des îlots de fibres péricycliques protègent un liber assez développé renfermant des cristaux d'oxalate de chaux en macles et rhomboèdres et parcouru par des rayons médullaires à une seule rangée de cellules. Le bois est fortement vasculaire, et le parenchyme plus ou moins lignifié. La moelle est à larges éléments avec de nombreuses macles d'oxalate de chaux.

Le composé tannoïde se localise dans *la première et aussi un peu dans la seconde assise de tissu collenchymateux, dans l'endoderme, au-dessus des îlots fibreux péricycliques, dans les rayons médullaires et à la périphérie de la moelle.* On en rencontre très peu dans le parenchyme cortical et le liber. L'épiderme n'en renferme pas (Pl. XIII).

3° **Écorce âgée.** — La structure anatomique d'une écorce âgée nous montre :

Un épiderme à cuticule épaisse avec, au-dessous, quelques assises de liège peu développé ; un phelloderme à cellules collenchymateuses allongées tangentiellement, puis un parenchyme cor-

Digitized by Google

tical dont les cellules fortement comprimées les unes contre les autres laissent peu de méats. A la partie la plus interne de ce parenchyme, on remarque de gros amas de fibres d'origine péricyclique.

Le liber est très développé avec de nombreux îlots de fibres libériennes disposées horizontalement. Le bois est fortement vasculaire. Le rayon médullaire, à une seule rangée de cellules, traverse le bois et le liber et se termine près du péricycle après s'être considérablement élargi.

La localisation du composé tannoïde se rapproche de ce que nous avons indiqué précédemment. Toutefois, le *phelloderme est très riche en cellules à glucoside*. On le rencontre aussi en grande quantité dans les cellules *de la région endodermique qui séparent deux amas fibreux péricycliques* (Voir Pl. XIII). La réaction est également intense vers la *partie externe du liber, au voisinage du péricycle*.

Les rayons médullaires offrent la même localisation que précédemment.

La répartition du glucoside dans le liber mérite d'attirer l'attention. Dans ce dernier tissu, la proportion de cellules donnant la réaction de la salicine et du tannin est d'autant plus grande que l'on s'éloigne plus du cambium, et les parties les plus riches sont celles qui avoisinent le péricycle.

La quantité de salicine qui se trouve dans une écorce âgée est proportionnellement plus grande que celle qui existe dans une jeune.

Le nombre de cristaux d'oxalate de chaux rhomboédriques est lui-même beaucoup plus élevé que dans une jeune écorce. C'est là un fait intéressant que nous avons signalé à propos du marronnier et qui mérite d'être indiqué à nouveau chez le *Salix alba* L.

La salicine se rencontre donc dans les mêmes cellules que l'acide salicitannique et se trouve vraisemblablement combinée à ce tanin.

Elle se localise principalement dans les assises *sous-épidermiques*, *l'endoderme*, *la périphérie de la moelle*, *les rayons médullaires*. Contrairement à ce que l'on rencontre chez l'*Æsculus*, le *Rhus Cotinus*, etc., l'épiderme du limbe en est totalement dépourvu.

Digitized by Google

CHAPITRE V

ESSAIS DE LOCALISATION DE LA CAFÉINE

Historique. — La caféine est un corps azoté que sa constitution éloigne des alcaloïdes et des glucosides. On la rencontre dans des végétaux appartenant à des familles très différentes. Elle fut isolée du café par RUNGE (1), en 1820. Sept ans plus tard, OUDRY (2) retira du thé un corps blanc cristallisé, auquel il donna le nom de **théine** et que JOBST (3), BERZELIUS (4), MULDER (5), HERZOG (6) identifièrent tour à tour avec la caféine.

En 1857, MARTIUS (7) retire du *Paullinia sorbilis* une substance cristalline, qu'il appela **guaranine**, que BERTHEMOT et DECHASTELUS (8) déclarent également identique à la caféine.

En 1843, STENHOUSE (9) isole ce composé de différents *Ilex*, et en

(1) RUNGE, *Schweigger's Journal für Chemie und Physik.*, t. XXXI, p. 308, 1820, et *Mater. z. Phytologie*, t. I, p. 146, 1821.

(2) OUDRY, Thein, eine organische Salzbase im Thee. *Magazin für Pharmacie.*, t. XIX, p. 49-50, 1827.

(3) JOBST, Thein identisch mit Caffein. *Liebig's Annalen*, t. XXV, p. 63-66, 1838.

(4) BERZELIUS, *Jahresbericht*, t. XVII, p. 302, 1837, t. XVIII, p. 388, 1838.

(5) MULDER., Chemische Untersuchung des chinesischen und javanischen Thees. *Poggend. Ann.*, t. XLIII, p. 161-183, 1838.

(6) HERZOG, Uber salzsaures Thein. *Liebig's Annalen*, t. XXVI, p. 344-345, 1838.

(7) MARTIUS, Uber die Zusammensetzung des Guaranin. *Ann. der Chem. und Pharm.*, t. XXXVI, p. 93-96, 1840.

(8) BERTHEMOT et DECHASTELUS, Chemische Untersuchung des Guarana. *Ann. der Chem. und Pharm.*, t. XXXVI, p. 90-93, 1840.

(9) STENHOUSE, Nachträgliches über das Thein. *Ann. der Chem. und Pharm.*, t. XLVI, p. 227-230, 1843.

Digitized by Google

1865, ATTFIELD (1) la découvre dans le *Cola acuminata R. Br*, qui fut ultérieurement l'objet de nombreux travaux. Il faut mentionner surtout l'ouvrage très complet de HECKEL et SCHLAGDENHAUFFEN (2).

Plus tard, SCHARLING (3) retire la caféine d'une Nyctaginée brésilienne, le *Neea theifera* ŒRSTEDT ; enfin, en 1883, SCHMIDT (4), prouve la présence d'une petite quantité de ce corps à côté de la théobromine dans les graines du *Theobroma cacao* L.

Au point de vue de sa composition et de sa constitution chimique, la caféine a été l'objet d'un grand nombre de mémoires ; citons en particulier ceux de STENHOUSE, NICHOLSON (5), PELIGOT, ROCHELEDER (6), HERZOG, STRECKER (7). Les derniers travaux de E. FISCHER (8) ont fixé complètement les rapports de la caféine avec les corps de la série urique, et l'on sait actuellement que ce composé, ainsi que ses congénères, théobromine, théophylline, dérivent d'un radical organique à chaîne fermée auquel FISCHER a donné le nom de « purine ». La caféine serait d'après cette théorie une triméthyldioxypurine.

Bien qu'elle diffère des glucosides, nous avons entrepris l'étude microchimique de la caféine, car les relations de ce corps avec les différents tanins existant dans les plantes qui la renferment avaient déjà attiré l'attention de certains auteurs. Ces composés tanniques sont l'acide cafétannique (café), corps de constitution voisine de

(1) ATTFIELD. On the food-value of the Kola-nut; a new source of theine. *Pharmaceutical Journal*, 2e sér., t. VI, p. 457-460, 1865.

(2) HECKEL et SCHLAGDENHAUFEN. Les Kolas africains. *Ann. de l'Inst. col. de Marseille*, t. I, 1er mém. Paris, 1893.

(3) ŒRSTED. Zur Beleuchtung der Blumen des brasilianischen Theestrauches (*Neea theifera*), *Bot. Zeit.*, t. XXVII, p. 216-224, 1869.

(4) SCHMIDT. Uber das Vorkommen von Caffein im Cacao. *Liebig's Annalen*, t. CCXVII, p. 306-308, 1883.

(5) NICHOLSON. Uber Caffein und einige seiner Verbindungen. *Ann. der Chem. u. Pharm.*, t. LXII, p. 71-82, 1847.

(6) ROCHELEDER. Uber das Caffein. *Ann. d. Chem. u. Pharm.*, t. LXIX, p. 120-125, t. LXXI, p. 1-12, 1849.

(7) STRECKER. Étude sur les transformations de la théobromine de la caféine, des acides parabanique, taurocholique, glycocholique et lactique. *C. R. Ac. Sc.*, t. LII, p. 1268-1271, 1861.

(8) E. FISCHER. Synthesen in der Puringruppe. *Ber. d. d. Chem. Gesellsch.*, t. XXXII, t. I, p. 435-504, 1899. Trad. *Monit. Sc. Quesneville*, t. LIII-LIV, p. 465-476, 552-576, 1899.

Digitized by Google

celle de l'esculine, l'acide kolatannique (kola) et un corps inconnu pour le thé.

L'étude microchimique de la caféine a déjà fait l'objet de nombreux travaux, parmi lesquels nous citerons ceux de Schimper (1), qui prétend que la localisation microchimique de la caféine n'est pas possible.

En 1891, Molisch (2) indique deux méthodes pour la caractérisation de cet alcaloïde au microscope.

La première méthode consiste à déposer sur une lame porte-objet une ou plusieurs coupes dans une goutte d'acide chlorhydrique concentré. Après une minute, on ajoute une goutte de chlorure d'or à 3 p. 100. Dès que le liquide commence à s'évaporer, on voit apparaître sur les bords de la goutte des aiguilles longues, jaunâtres, d'un aspect caractéristique, qui représentent un chloro-aurate de caféine.

Dans la seconde méthode de Molisch pour caractériser la caféine, on place les coupes dans une goutte d'eau distillée et l'on chauffe jusqu'à 100°. On laisse ensuite l'eau s'évaporer entièrement. On verse alors sur la lame une goutte de benzine, qui s'empare de la caféine et, en s'évaporant, laisse un grand nombre de cristaux caractéristiques.

Hanauseck (3), dans des recherches qui suivirent de près celles de Molisch, emploie également le chlorure d'or comme réactif. L'auteur fait en outre remarquer qu'il se dépose au bord de la lamelle des cristaux de chlorure d'or présentant une forme particulière par suite de la cristallisation au sein d'une liqueur chlorhydrique. Ces cristaux peuvent être facilement confondus avec ceux de la combinaison de caféine ; ils sont un peu plus gros, un peu plus courts et ne se terminent pas en pointe, comme ces derniers.

Ces méthodes sont bien peu exactes, et Molisch lui-même, dans l'examen du thé, a pu caractériser la caféine dans les jeunes feuilles,

(2) Shimper. *Anleitung z. mikroskopischen Untersuchung d. Nahrunsg-Genussmittel.* Iéna, 1886.

(1) Molisch. *Loc. cit.*

(3) Hanausek. Zur histochemischen Caffeinreaction. *Zeitschr. d. Allg. Œst Apoteker-Vereines*, p. 606-609, 1891.

Digitized by Google

mais n'a obtenu aucun résultat avec les feuilles adultes, qui sont cependant riches en principe actif.

La recherche microchimique de la caféine a été tentée aussi par L. Gaucher (1), au moyen de l'iodure de potassium iodé, du ferricyanure de potassium, du molybdate d'ammoniaque, de l'acide phosphomolybdique, du vanadate d'ammoniaque, du tungstate de soude et enfin du chlorure d'or. L'auteur reconnaît que par ce procédé il n'a pas déterminé la localisation de la caféine au sens que l'on accorde à ce mot. Sa méthode consiste à traiter les coupes par l'acide chlorhydrique afin d'isoler la caféine de sa combinaison, et à la caractériser par la teinte que prennent au bout d'un certain temps les précipités obtenus avec le chloromolybdate d'ammoniaque, l'acide phosphomolybdique et le vanadate d'ammoniaque. Malheureusement, ces colorations ne sont nullement caractéristiques, et il arrive très souvent que, dans la localisation des alcaloïdes, on observe de telles réactions sans que l'on puisse en tirer aucune conclusion. Elles sont simplement la preuve d'une réduction des réactifs, que diverses substances organiques peuvent tout aussi bien produire que les alcaloïdes. Ces réactions microchimiques n'ont pas grande valeur et ont amené l'auteur à admettre que la jenne plantule de *Coffea* non encore pourvue de chlorophylle ne renferme pas de caféine. Cette conclusion a été depuis reconnue inexacte par les derniers travaux de Clautriau.

Dans un travail récent, H. Behrens recommande comme réactifs permettant la recherche microchimique de la caféine le chlorure mercurique et le nitrate d'argent en solution nitrique.

Pendant son séjour à Buitenzorg, Clautriau (2) essaya en vain de déterminer la localisation de la caféine dans le caféier et le thé. Il obtenait bien des précipitations de principes actifs dans les cellules, mais généralement ces précipités n'étaient pas seuls, d'autres les accompagnaient ; ils pouvaient prêter à confusion, et empêchaient de se rendre compte de la marche de la précipitation de la caféine. « Il eût fallu, dit-il, pouvoir vérifier ces précipitations par

(2) L. Gaucher. *Loc. cit.*

(1) G. Clautriau. Nature et signification des alcaloïdes végétaux. *Ann. de la Soc. royale des Sc. médic. et nat. de Bruxelles*, t. IX, fasc. II, p. 113, 1900.

Digitized by Google

une réaction colorée, mais cette réaction ne se produit pas dans les tissus, non pas à cause d'une trop faible quantité de substance, ainsi que le pensent certains auteurs, mais par suite de la présence des matières organiques. Il n'en résulte pas que je considère la localisation microchimique de la caféine comme impossible, mais elle présente de grandes difficultés et demande encore de longues études préliminaires. »

Renonçant aux expériences microchimiques, l'auteur eut alors recours à l'analyse chimique dans ses recherches ultérieures sur le caféier et le thé.

Examen des réactions pouvant être employées à la localisation de la caféine. — Avant d'exposer nos résultats, il est indispensable de donner rapidement les caractères chimiques de la caféine et d'indiquer les réactions susceptibles d'être utilisées en microchimie.

La caféine se présente sous forme d'aiguilles blanches, soyeuses, enchevêtrées. Les cristaux renferment une molécule d'eau de cristallisation, lorsque la cristallisation a eu lieu en milieu aqueux. Ils sont, au contraire, anhydres, si elle a lieu en milieu alcoolique ou chloroformique. Elle commence à se volatiser à la température de 177° et fond vers 234°.

Son meilleur dissolvant est le chloroforme, qui peut en dissoudre 13 p. 100 ; puis vient l'alcool à 85°, 2,3 p. 100 ; l'eau, 1,30 p. 100 ; l'alcool absolu, 0,60 p. 100 ; le sulfure de carbone, 0,06 p. 100 ; l'oxyde d'éthyle, 0,05 p. 100. A l'ébullition, l'ordre de solubilité se modifie, l'eau vient en première ligne et en dissout 45 p. 100 ; le chloroforme, 19 p. 100. La solution aqueuse de caféine est neutre ; elle n'a aucune action sur le papier de tournesol. Cependant les acides se combinent avec elle pour former des sels solubles, mais ces combinaisons sont très instables et se détruisent même par l'eau ou l'alcool. Si l'on ajoute un alcali à la solution d'un pseudo-sel de caféine, le composé ne précipite pas à cause de sa solubilité plus grande dans les liquides alcalins que dans l'eau.

La solution aqueuse de caféine traitée par l'iodure de potassium iodé ne précipite pas.

En milieu chlorhydrique on obtient par ce réactif un précipité brun très abondant, encore sensible au 1/2000, d'après Gaucher.

Digitized by Google

L'iodure double de mercure et de potassium détermine dans une solution chlorhydrique de caféine un précipité blanc jaunâtre disparaissant rapidement.

On constate, dans certains cas, après la disparition du précipité, une cristallisation abondante d'aiguilles rayonnantes et d'aspect caractéristique. Clautriau n'a pas déterminé les proportions de réactif et d'acide chlorhydrique indispensables pour amener la formation de ces cristaux.

La caféine précipite en rouge vif par le réactif de Dragendorff (iodure double de bismuth et de potassium) en solution légèrement acide et donne après quelque temps des prismes de couleur rubis.

L'acide phosphomolybdique détermine en milieu chlorhydrique un précipité blanc jaunâtre.

Le tanin produit un précipité blanc cailleboté. Le bichlorure de mercure, le chlorure de platine donnent des précipités cristallisés. Mais il faut pour ces réactions opérer en liqueur assez concentrée, car en solution diluée le liquide reste limpide.

Citons encore les réactifs indiqués par L. Gaucher.

Le ferricyanure de potassium produit en milieu chlorhydrique, après évaporation du liquide, des aiguilles bleues caractéristiques.

Le réactif de Gardiner (solution saturée de molybdate d'ammoniaque dans le chlorhydrate d'ammoniaque) détermine un précipité blanc amorphe dans la solution chlorhydrique de caféine. Ce précipité est soluble à chaud ; si l'on évapore à siccité, il cristallise et laisse déposer des cristaux acidulaires qui ne tardent pas à se colorer en bleu par suite de la réduction de l'acide molybdique

Le tungstate de soude en solution saturée dans l'acétate de soude donne un précipité blanc cailleboté très abondant. Ce précipité devient jaune sous l'action de la chaleur ou par simple exposition à l'air.

Le vanadate d'ammoniaque ne produit qu'un trouble léger dans une solution chlorhydrique de caféine ; mais si on laisse évaporer à chaud ou à froid, on obtient un résidu d'un beau rouge.

La caféine possède aussi une réaction colorée : évaporée à siccité avec un oxydant énergique, tel que l'acide azotique, l'eau de

Digitized by Google

chlore ou de brome, elle laisse un résidu brun rouge (d'acide diméthylparabanique qui, au contact de l'ammoniaque, prend une belle coloration rouge pourpre due à la formation de murexide). Cette réaction se produit difficilement en présence de matières organiques. De plus, si l'on fait la réaction avec l'eau de chlore, la proportion de chlore ne doit pas dépasser 1,5 à 3 fois celle de la caféine. On peut, dans ces conditions, obtenir une réaction avec 0,000025 et même 0,00001 de caféine [Dragendorff (1)]. Ajoutons encore qu'un excès d'ammoniaque empêche la réaction de se produire.

Essais de localisation de la caféine. — Nous avons vu que les méthodes de localisation consistant à précipiter la caféine dans les cellules, au moyen de réactifs appropriés, n'avaient pas donné de résultats bien caractéristiques aux auteurs qui les avaient utilisées ; il était donc rationnel de recourir aux réactions colorées.

La formation de la murexide avec l'acide azotique comme corps oxydant n'ayant donné aucun résultat, nous avons employé l'eau de chlore, en tenant compte de la remarque faite par Dragendorff. Les coupes sont au préalable plongées dans l'eau additionnée d'acide chlorhydrique et disposées sur une lame avec quelques gouttes d'une solution chlorée renfermant : eau de chlore saturée, 5 gouttes, et eau, 2 centimètres cubes. On chauffe très légèrement la lame et on laisse ensuite la solution s'évaporer à l'air libre. La préparation prend peu à peu une teinte brunâtre ; on la recouvre d'une lamelle et on dispose sur le bord une goutte d'ammoniaque un peu diluée. Par capillarité la solution ammoniacale arrive bientôt au contact de la coupe, et en suivant la réaction au microscope, on voit certaines cellules prendre une teinte rouge foncé qui par diffusion colore peu à peu toute la préparation.

Cette réaction semblerait attribuable à la caféine. Elle se produit avec les feuilles du *Coffea*, du *Thea sinensis* L. et les graines de *Cola acuminata* R. B.

Nous croyons cependant qu'elle doit être attribuée à la présence du composé tannique. Elle se produit en effet dans des conditions identiques avec les feuilles de l'*Æsculus Hippocastanum*. De plus, les feuilles de caféier, de thé, les graines de kola soumises au

(1) Dragendorff. *Die gericht.-chem. Ermittelung. von Giften*, 3. Aufl. Göttingen, 1888. p. 197.

Digitized by Google

réactif de Sonnenschein pendant deux à trois secondes, et passées rapidement dans l'ammoniaque, donnent une réaction semblable à celle de l'esculine.

Ce résultat pourrait paraître surprenant si nous n'avions pas fait remarquer au début les analogies existant entre l'esculine et l'acide caféique. Or l'acide cafétannique n'est qu'un glucoside spécial de l'acide caféique, et il est fort possible que ce soit ce composé qui donne une réation analogue à celle de l'esculine.

Les feuilles de thé et les graines de kola donnent des réactions identiques soit par l'eau de chlore avec addition d'ammoniaque, soit par la réaction de Sonnenschein; il est de toute vraisemblance que le tanin de ces végétaux possède une constitution chimique voisine de celle de l'acide cafétannique.

En résumé, bien que la coloration rouge violacé obtenue par nous dans l'expérience précédente soit absolument identique à celle qui se produit *in vitro* par la formation de la murexide, nous ne croyons pas pouvoir la rapporter dans ce cas à la caféine. Ce sont les composés tanniques du café, du thé, de la kola, corps ayant une constitution identique ou voisine à celle de l'acide cafétannique, qui produisent cette réaction. Ajoutons encore pour justifier notre hypothèse que les réactifs du tanin donnent des précipités abondants dans les cellules qui se colorent en rouge par l'action des réactifs.

Nos recherches n'ont donc pas été plus positives que celles de Clautriau ; mais, nous basant sur les résultats obtenus avec l'*Æsculus Hippocastanum*, nous avons pensé que la caféine existait dans la plante combinée au tanin : cette opinion avait d'ailleurs été émise par Payen (1) en 1849.

Essais chimiques en vue d'isoler le composé tannoïde complexe dont la caféine serait un constituant. — Cherchant de nouvelles bases pour confirmer cette hypothèse vraisemblablement exacte, nous avons alors effectué les expériences suivantes :

Première Expérience. — 50 grammes de thé vert concassé sont épuisés à froid par le chloroforme jusqu'à ce que la solution chloroformique passe incolore. Le dissolvant est ensuite distillé et le résidu

(1) Payen. Sur la caféine. *Ann. de chim. et phys.*, 1849, 3e s., XXVI, 108.

Digitized by Google

repris à chaud par 5 centimètres cubes d'acide sulfurique au 1/10; la solution sulfurique est filtrée pour la séparer d'une masse noire élastique s'agglomérant sous l'agitateur, puis alcalinisée par l'ammoniaque et épuisée par le chloroforme. L'évaporation de la solution chloroformique a fourni 0,069 de caféine. Le thé provenant de l'épuisement chloroformique est alors additionné de 200 à 250 centimètres cubes d'eau et maintenu à l'ébullition une demi-heure. On évapore ensuite au bain-marie à siccité ; on sèche rapidement à l'étuve et on épuise à nouveau par le chloroforme. La solution chloroformique, traitée comme précédemment, laisse comme résidu 0,52 de caféine.

L'échantillon du thé renfermait donc 1,138 de caféine p. 100. Ce composé était peut-être en petite quantité à l'état libre dans la plante, mais la plus grande partie s'y trouvait sous forme de combinaison facilement dissociable par l'eau bouillante. Cette action particulière de l'eau avait été déjà signalée par Petit et Terrat (1) dans un mémoire sur le dosage de la caféine.

Deuxième Expérience. — On prend 300 grammes de thé vert, que l'on épuise presque complètement par de l'alcool à 95°, et on distille la solution à sec dans le vide à la température la plus basse possible ; on obtient un résidu verdâtre qui est alors épuisé par du chloroforme absolument sec. Les solutions chloroformiques sont recueillies et distillées et donnent comme résidu une masse noire verdâtre élastique. Le produit non soluble dans le chloroforme se présente, après plusieurs lavages au chloroforme sec, sous la forme d'une poudre grise verdâtre donnant avec le perchlorure de fer une coloration vert intense.

Malgré les pertes dues aux difficultés que l'on éprouve dans la filtration des solutions chloroformiques, nous avons obtenu 20 grammes de produit.

On prend 5 grammes de ce composé, que l'on dissout dans l'alcool absolu.

On partage la solution en deux parties égales. Dans l'une on ajoute immédiatement une solution alcoolique d'acétate de cuivre qui précipite le composé tannique et on filtre ; l'autre, additionnée de

(1) Petit et Terrat. Sur le dosage de la caféine dans le thé. *Bull. Soc. chim.*, 3e sér., t. XV, p. 811-815, 1896.

Digitized by Google

200 à 300 centimètres cubes d'eau, est soumise à une ébullition prolongée de deux à trois heures. Au bout de ce temps, le liquide est filtré et le précipité lavé à l'eau bouillante. Les solutions alcoolique et aqueuse sont évaporées, et le dosage de la caféine nous donne :

Pour la solution alcoolique, 0 gr. 08 de caféine.

Pour la solution aqueuse, 0 gr. 18 —

La proportion de caféine contenue dans le résidu verdâtre provenant de l'épuisement au chloroforme était de 0 gr. 04.

Nous aurions donc dans l'extrait provenant de l'épuisement de 300 grammes de thé vert environ 2 gr. 50 de caféine.

Ces déterminations ont été refaites plusieurs fois, et nous avons toujours obtenu des résultats analogues.

Les chiffres indiqués dans les résultats précédents n'ont pas une valeur très grande. On peut se trouver en présence de variations assez grandes dans le rendement en caféine. Dans l'état actuel de nos connaissances, il est difficile de déterminer les causes qui occasionnent ces différences. Au contraire le rapport 1/2 des poids de caféine obtenu par le dosage des solutions alcooliques et aqueuses après le traitement indiqué est toujours invariable.

Il semble donc que par l'ébullition l'eau a détruit un composé qui empêchait la caféine d'entrer en solution dans le chloroforme. Ce composé précipitant par l'acétate de cuivre est selon toute vraisemblance un composé tannique.

2° Expériences sur le Kola acuminata. — On prend environ 250 grammes de noix de kola fraîche et blanche que l'on découpe en les laissant tomber au fur et à mesure dans de l'alcool à 98° bouillant. On maintient l'ébullition pendant environ un quart d'heure. Après refroidissement, on retire la noix de kola, on la pulvérise au moulin et on épuise à nouveau avec une quantité suffisante d'alcool à 98°. Les solutions alcooliques sont évaporées dans le vide à la plus basse température possible et finalement on termine l'évaporation dans le vide sulfurique. Le résidu sec ainsi obtenu pesait 25 grammes ; on prélève 10 grammes de ce produit que l'on traite par le chloroforme pendant quarante-huit heures ; la solution chloroformique évaporée donne 0 gr. 162 de caféine. Le résidu non soluble dans le chloroforme est alors repris par l'alcool absolu, et il reste indissous un corps blanc ne donnant pas les réactions du tanin.

Digitized by Google

La solution alcoolique est alors partagée en deux parties égales. L'une est aussitôt traitée par l'acétate de cuivre dissous dans de l'alcool et filtrée ; l'autre, après addition d'une certaine quantité d'eau et ébullition de quelques heures, est également précipitée par l'acétate de cuivre ; on filtre et on lave le précipité à l'eau bouillante. Le dosage de la caféine dans les solutions alcoolique et aqueuse filtrées nous a donné :

Pour la solution alcoolique, 10 centigrammes de caféine ;

Pour la solution aqueuse, 19 centigrammes.

L'essai préliminaire fait sur environ 12 grammes de matière nous avait donné les quantités suivantes de caféine :

Pour la solution alcoolique, 11 centigrammes ;

Pour la solution aqueuse, 20 centigrammes.

La solution chloroformique, provenant de l'épuisement des 12 grammes d'extrait sec, renfermait 31 centigrammes de caféine. Ainsi qu'on peut le voir, la solution aqueuse après ébullition donne un poids de caféine qui est le double de celui qu'on retire de la solution alcoolique précipitée immédiatement par l'acétate de cuivre. C'est là un fait identique à celui que nous venons d'indiquer pour le thé et qui doit provenir de ce que la caféine est en partie combinée au tanin existant dans la noix de kola.

Bien que cette hypothèse soit vraisemblable, les résultats obtenus ne sont pas assez positifs pour permettre une affirmation.

Nos recherches microchimiques sur la localisation de la caféine n'ont donc pas été plus fructueuses que celles de Clautriau, et les expériences chimiques entreprises en vue de rechercher s'il existait une relation entre la caféine et le tanin de la plante ne permettent pas d'adopter une théorie avec certitude.

Digitized by Google

QUATRIÈME PARTIE

CONCLUSIONS

A. — L'esculine peut facilement se localiser chez l'*Æsculus Hippocastanum* au moyen de la réaction de Sonnenschein. Cette réaction, qui s'applique à la recherche de ce glucoside chez le *Pavia*, conviendra de même à d'autres plantes supposées contenir de l'esculine, telles que, par exemple, la racine de *Gelsemium*.

Ce réactif peut encore servir à la recherche microchimique de la fustine, de la fraxine, de l'acide cafétannique, corps de constitution chimique voisine de celle de l'esculine ; toutefois, les réactions obtenues sont moins caractéristiques qu'avec ce dernier glucoside.

Dans l'*Æsculus Hippocastanum*, l'esculine se rencontre dans tous les organes de la plante, à l'exception des cotylédons et de la radicule. Elle se localise en très petite quantité dans les parenchymes et les rayons médullaires, mais les tissus d'élection privilégiée sont *l'épiderme*, *l'endoderme*, *la périphérie de la moelle* ; l'examen des coupes de feuilles très jeunes ou encore enfermées dans le bourgeon ne laissent aucun doute à cet égard. Il est intéressant de faire remarquer la localisation toute spéciale du glucoside dans l'assise externe périphérique de la moelle, assise qui se trouve au contact des éléments ligneux. Ce fait semblerait venir appuyer l'hypothèse des auteurs qui veulent comparer le rôle morphologique de cette assise périmédullaire à celui de l'assise endodermique.

L'esculine ne se rencontre pas dans les tissus morts ni dans les cellules des méristèmes. Elle existe dans les poils épidermiques,

Digitized by Google

les cellules stomatiques, mais fait défaut dans les cellules à oxalate de chaux, fibres, tubes criblés, vaisseaux du bois.

Dans l'écorce de la tige la quantité d'esculine va en augmentant du centre vers la périphérie. Le liber jeune en est totalement dépourvu. Le nombre des cristaux d'oxalate de chaux est naturellement plus élevé à mesure que l'on s'éloigne du cambium. Les rhytidomes successifs en se détachant de l'arbre emportent une grande partie de l'esculine, tandis qu'une certaine quantité persistant dans le parenchyme situé plus profondément ne sera éliminée que par la formation d'une nouvelle assise subéro-phellodermique.

Dans l'écorce âgée de la racine, la localisation de l'esculine est identique à celle observée dans la tige ; mais dans la racine primaire elle se rencontre surtout dans *l'endoderme*, *le péricycle*, *le parenchyme libérien*. Il en existe très peu dans le parenchyme cortical et jamais dans les poils absorbants.

L'esculine n'est pas un produit direct de l'assimilation chlorophyllienne : on n'en rencontre guère, en effet, dans le parenchyme chlorophyllien ; et les cellules du collenchyme sous-épidermique, riches en esculine, renferment très peu de granulations chlorophylliennes. La lumière ne joue aucun rôle dans la production de ce glucoside, puisqu'il se forme également dans les graines germées à l'obscurité. Toutefois, dans les organes aériens, l'esculine se trouve en plus grande abondance dans les parties exposées à la lumière.

La graine, à l'exception des téguments, ne renferme pas d'esculine ; mais dès les premiers symptômes de la germination on peut y signaler sa présence. Sa formation semble donc s'effectuer dans l'obscurité par les transformations chimiques des substances de réserve accumulées dans l'embryon.

Le fait que, d'une part, une grande partie de l'esculine est rejetée par le rhytidome, et que, d'autre part, elle apparaît lors de la germination dans des organes en voie de développement ne permettent pas d'envisager ce corps comme une matière de réserve.

B. — Le tanin du marronnier se trouve localisé dans les mêmes cellules que l'esculine. Il n'existe pas dans la graine (cotylédons et radicule) et apparaît concurremment avec l'esculine dès les premiers phénomènes de la germination. Il se rencontre dans tous les organes où l'on peut déceler l'esculine.

Digitized by Google

C. — Si l'on cherche à enlever l'acide esculitannique par l'alcool absolu, — véhicule dans lequel l'esculine est insoluble, — on ne peut plus retrouver cette dernière substance par voie microchimique ; elle est, en effet, disparue en même temps que l'acide esculitannique ; vraisemblablement elle doit être en combinaison faible avec ce tanin, et cette combinaison est soluble dans l'alcool. C'est ce composé (esculitannate d'esculine) que le traitement par l'alcool absolu fait disparaître. On s'explique aisément l'impossibilité de caractériser l'esculine, puisque cette combinaison l'a rendue soluble, et aussi pourquoi les cellules donnent à la fois les réactions du tanin et de l'esculine. Ce produit tanno-glucosidique dissous dans l'alcool et précipité par l'acétate de cuivre ne donne que de faibles quantités d'esculine après élimination du cuivre et évaporation de l'alcool. Au contraire, le même produit traité d'abord par l'eau à l'ébullition, puis par l'acétate de cuivre, donne une solution qui laisse déposer après évaporation une quantité assez grande d'esculine.

En somme, il semble naturel de considérer le composé complexe tannique (tanin, glucose, esculétine) existant dans la plante comme une combinaison de l'esculine avec un composé ayant les réactions des tanins. Dans ces conditions, le glucoside existant dans les cellules apparaîtrait comme une combinaison bien définie d'esculine et du tanin et serait de l'esculitannate d'esculine. L'esculine elle-même résultant de la combinaison du glucose et de l'esculétine, il se rapprocherait par suite de ces **doubles glucosides** d'Aweng, signalés par cet auteur dans le *Rhamnus frangula* (1).

Cette combinaison (tanin, glucose, esculétine) est excessivement hygrométrique et de plus se dédouble très aisément sous des influences diverses, et le simple contact de l'eau bouillante suffit à opérer le dédoublement.

D. — Il est permis de conclure des recherches sur la fustine, la salicine, la fraxine, la caféine et sur les cinchona publiées antérieurement à ce travail, que beaucoup de composés : glucosides, alcaloïdes, se trouvent de même combinés totalement ou partiel-

(1) Awweng. Die Isolierung der wirksamen Bestandteile von Frangula, etc... *Apotheker Zeitung*, t. XVI, 1901, p. 257-259, 538-540.

Digitized by Google

lement dans la plante avec un corps possédant les réactions du tanin. Ce composé tanno-glucosidique ou tanno-alcaloïdique, véritable tanin physiologique élaboré par la plante, est toujours très soluble dans l'eau, l'alcool, et, dans la plupart des cas, constitue le principe médicamenteux actif de certaines plantes médicinales. C'est de ce composé qu'on extrait par des méthodes chimiques les alcaloïdes ou glucosides à fonction chimique déterminée et qualifiés principes actifs des végétaux. On ne sera donc pas étonné des différences d'action physiologique (pharmacodynamique) des alcaloïdes et de certaines préparations galéniques contenant le composé complexe primordial.

La localisation des glucosides, alcaloïdes devient alors plus facile, puisqu'elle tend à se réduire dans la plupart des cas à la recherche du tanin. On pourrait peut-être tirer de ces considérations une méthode générale de localisation de ces composés ; mais il est indispensable auparavant de bien vérifier par des réactions microchimiques que l'alcaloïde ou le glucoside et le tanin se trouvent simultanément dans les mêmes cellules. Nous avons vu que, dans le *Dalphne alpina*, le glucoside ne se trouve pas combiné avec du tanin. Il en est de même pour certains alcaloïdes comme nous avons eu l'occasion de l'observer dans certains cas au cours de nos études.

La méthode osmotique est celle qui donne les meilleurs résultats dans la recherche de localisation de ces composés tanniques. Les réactifs qui doivent être préférés sont : le bichromate de potasse, l'acétate de cuivre, le molybdate d'ammoniaque, le réactif de Bræmer, l'acétate d'urane.

En général, ces composés alcaloïdiques ou glucosidiques sont surtout localisés dans l'épiderme, la zone sous-épidermique corticale, le phelloderme et la région périmédullaire. Les parenchymes divers en renferment seulement de petites quantités.

*
* *

Ces résultats indiqués, il nous resterait à envisager le rôle physiologique des alcaloïdes et des glucosides. Sont-ce des produits d'excrétion ou jouent-ils le rôle de substance de réserve ? Les deux opinions sont soutenues avec des arguments sérieux, de sorte qu'il est assez difficile de se prononcer.

Digitized by Google

Sachs (1), Pfeffer (2), Errera (3) considèrent les alcaloïdes comme des déchets qui peuvent secondairement servir pour la protection de la plante. Clautriau (4), dans différents mémoires, admet et défend avec énergie cette hypothèse. Heckel (5) professe une opinion contraire, et le premier il s'attache à la démontrer expérimentalement. Ce sont ses travaux qui sont toujours invoqués par les partisans de cette théorie et en particulier par Barth (6), qui a repris les expériences d'Heckel.

Clautriau réfute l'opinion d'Heckel et de Gaucher, qui considèrent la caféine comme un aliment de la plante; il réfute également les expériences de Heckel et de Barth sur la germination du *Datura stramonium* et établit que l'alcaloïde contenu dans les graines ne peut guère être considéré comme une substance de réserve par suite de la localisation spéciale de ce produit, qu'il n'est pas nécessaire à la germination et qu'enfin, au début du développement de la plante, on observe non une utilisation, mais une production d'alcaloïde.

Albo (7) considère comme produit de réserve la solanine, glucoside existant dans divers *Solanum*; il a constaté que, pendant la première période de la vie de la plante, la solanine disparaissait peu à peu, aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité ou dans une atmosphère privée de CO^2, comme si elle constituait une réserve nutritive.

(1) Sachs. *Vorlesungen uber Pflanzenphysiologie*, p. 396, 1882.

(2) Pfeffer. *Pflanzenphysiologie, II. Aufl.*, p. 399 et 499, 1897.

(3) Errera. Efficacité des structures défensives des plantes. *Bull. Soc. roy. bot. Belgique*, t. XXV, 1886.

(4) G. Clautriau. L'azote dans les capsules de pavot. *Bull. de la Soc. belge de microscopie*, t. XVIII, p. 80-93, 1892.

G. Clautriau. Localisation et signification des alcaloïdes dans quelques graines. *Ann. de la Soc. belge de microsc.*, t. XVIII, p. 35-54, 1894.

G. Clautriau. Nature et signification des alcaloïdes végétaux, *loc. cit.*

(5) Ed. Heckel. Sur l'utilisation et les transformations de quelques alcaloïdes dans la graine pendant la germination. *C. R. Ac. Sc.*, t. CX, p. 88-90, 1890.

(6) H. Barth. Studien uber den mikroch. Nachweis von Alkaloiden in Arzneidrogen. *Loc. cit.*

(7) Albo. Sulla funzione fisiologica della Solanina (tiré de A. Borzi). *Contrib. Biolog. végét.*, vol. II, fasc. III, 1899. In Clautriau. *Nat. et significat. des alcaloïdes*, p. 98.

Digitized by Google

Il a remarqué que, dans la suite, elle réapparaissait au cours du développement normal de la jeune plante, alors que l'assimilation du carbone s'était manifestée. Il admet donc que la solanine est un véritable produit de réserve.

Ses recherches ne sont pas complètement d'accord avec celles de Molle (1), qui a étudié le même sujet ; et Clautriau fait remarquer avec juste raison que l'examen microchimique n'a pas été contrôlé par une analyse chimique. Pendant la germination, la concentration de l'alcaloïde peut varier dans la cellule même, suivant la quantité d'eau absorbée et, par suite, la réaction microchimique être plus ou moins intense. Les résultats obtenus par voie microchimique ne peuvent avoir de valeur réelle sur la teneur quantitative en solanine qu'autant que l'analyse sera venue les confirmer.

Il faudrait, pour attribuer aux alcaloïdes le rôle de réserve, que la plante, mise dans l'impossibilité d'assimiler ou d'élaborer de nouveaux matériaux azotés, puisse utiliser ses alcaloïdes, comme on l'observe pour l'amidon chez une plante mise dans un milieu privé d'acide carbonique.

Or les expériences de ce genre entreprises par Clautriau sur le *Papaver somniferum* et l'*Atropa Belladona* ont montré que l'alcaloïde reste dans la plante tant que cette dernière ne dépérit pas.

Les essais de nutrition des plantes au moyen de solutions azotées ont toujours donné un résultat négatif. Marcet (2) et Shulber (3) avaient remarqué l'action nuisible des solutions d'alcaloïdes sur les plantes. Knop et Wolf (4) constatent aussi leur inutilisation, tandis que Réveil (5) prétend que l'atropine est un véritable engrais.

(1) Molle. *Loc. cit.*

(2) Marcet. De l'action des poisons sur le règne végétal. *Ann. de chim. et phys.*, t. XXIX, p. 200-225, 1825.

(3) Schulber. Untersuch. über die Einwirkung verschiedener Stoffe des organischen und unorganischen Reiches auf das Leben der Pflanzen. *Flora*, t. II, p. 753, 1827.

(4) Knop u. Wolf. Notiz. über die stickstoffhaltigen Nahrungsmittel der Pflanzen. *Die landwirtsch. Versuchsst.*, t. VII, p. 308, 1865.

(5) Réveil. *Recherches de physiologie végétale. Action des poisons sur les plantes.* Lyon, 1865.

Digitized by Google

Malheureusement, les expériences de ce dernier auteur n'ont pu être répétées par MARCACCI (1) et DE VARIGNY (2).

Il semble donc que l'atropine ne favorise pas le développement des jeunes plantes ; il en est de même des autres alcaloïdes, ainsi que le prouvent les travaux de DE TONI et MACH (3) et d'OTTO (4).

Le rôle physiologique des tanins est encore moins bien connu. ~~Sachs~~ les considère comme matière de réserve. GUBLER (5) prétend que le tanin se transforme en sucre dans les végétaux et principalement dans les feuilles de thé. FIHLOL et CHATIN (6) ne croient pas à cette transformation et les considèrent comme un aliment respiratoire ; leur théorie a été depuis reprise par WARMING (7) et GERBER (8).

Depuis 1875 il existe donc un double courant sur le rôle physiologique de ces principes immédiats. Les uns, suivant SACHS (9), GARDINER (10), CHARBONNEL-SALLE (11), en font des produits d'excrétion ; les autres, avec HARTIG (1) et WIGAND (2), en font des produits servant à la nutrition. Pour SCHELL (3), les deux opinions peuvent se soutenir suivant le végétal considéré.

(1) MARCACCI. L'azione degli alcaloidi nel regno végétale et animale. *Annali di chimica farmacologica*. Milano, 1887. In CLAUTRIAU. *Nat. et significat. des alcaloïdes*, p. 103.

(2) DE VARIGNY. L'atropine est-elle un engrais végétal ? *Revue générale de botanique*, t. IV, p. 407-420, 1892.

(3) DE TONI et MACH. Sopra l'influenza esercitata dalla nicotina e dalla solanina sulla germogliazione dei semi di tabacco. *Boll. d. r. Instituto bot. d. Universita Parmensè*, p. 63, 1893. Parma, in CLAUTRIAU. *Nat. et significat. des alcaloïdes*, p. 103.

(4) R. OTTO. Welchen Einfluss haben Strychninlösungen auf die Entwicklung von Pflanzen. *Naturw. Wochensch.*, t. IX, p. 625, 1894.

(5) GUBLER. *Bull. Soc. bot.*, t. XI, p. 181-182. (Discussion entre Gubler et Chatin), 1864.

(6) CHATIN. Études sur la respiration des fruits. *C. R. Ac., Sc.*, t. LVIII, p. 576-579, 1864.

(7) WARMING. Beobacht. üb. Pflanz. mit überwinter. Laubblätter. *Botan. Centralb.*, t. XVI, p. 350-351, 1883.

(8) C. GERBER. Rôle des tanins dans les plantes et plus particulièrement dans les fruits. *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXIV, p. 1106-1108, 1897.

(9) SACHS. Mikrosk. Untersuch. Physiolog., Untersuch. üb. Keimung d. Schming bohne. *Sitzb. Ak. Wiss. Wien*, XXXVI, p. 23, XXXVII, p. 57.

(10) GARDINER. *Procedings of the Cambridge physiological Society*, vol. IV, p. 393.

(11) CHARBONNEL-SALLE. *Recherches sur le rôle physiologique du tanin dans les végétaux*. Th. Sc. Paris, 1881. 31 p. in 8°.

Digitized by Google

Dans son très intéressant travail, G. Kraus (4) admet que le tanin est un « produit quotidien de la feuille », sans toutefois prendre parti pour une théorie.

D'ailleurs, il n'est guère probable que la question soit si rapidement tranchée ; de nombreuses discussions sur ce sujet sont à prévoir et avant de pouvoir conclure en faveur de l'une ou de l'autre opinion, il est nécessaire d'accumuler un très grand nombre de faits.

Bien que nos expériences sur l'esculine ne nous permettent guère d'envisager ces corps : *alcaloïdes*, *glucosides*, *tanins*, *comme des substances de réserve*, il est indispensable, avant de nous rallier entièrement aux idées de Clautriau, de répéter des expériences analogues sur un plus grand nombre de plantes. C'est donc un ensemble de faits que nous apportons aujourd'hui, nous proposant d'entreprendre de nouvelles recherches en vue d'élucider cette question ; l'étude de la relation existant entre les tanins et les alcaloïdes et glucosides ; la connaissance exacte de la composition chimique de ces corps avancera beaucoup la solution de ce problème. Si le dernier mot appartient aux analyses chimiques, il est d'ores et déjà facile de se rendre compte des réels services que pourra rendre la méthode suivie dans nos recherches sur l'*Æsculus Hippocastanum*.

En permettant de s'assurer du siège exact de ces composés, de les suivre pas à pas dans la plante, de les décéler par un examen rapide et sûr dans les organes les plus délicats, elle deviendra alors l'auxiliaire indispensable de la méthode chimique.

(1) Hartig. Weitere Mittheilungen das Gerbmethl betreffend. *Bot. Zeit.*, XXIII, p. 53-57, p. 237-238, 1865. — *Gersbtoff d. Eiche*, 40 pages in-8°. Cf *Anat. u. Physiol. d. Holzgewächse*, p. 119, 1878.

(2) Wigand. Sitz d. China-Alkaloïde et Sätze üb. physiol. Bedeut. d. Gerbstoffs. *Bot. Zeit.*, t. XX, p. 241.

(3) Shell. *Physiol. Untersuh. d. Gerbsaüre.* — Pflanzenphysiologie, t. I, p. 305.

(4) G. Kraus. *Grundlinien zu einer Physiologie des Gerbstoffs*, in-8°. Leipsig, 1889.

Digitized by Google

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

Albo. — Sulla funzione fisiologica della Solanina (tiré de **A. Borzi**) *Contrib. biolog. végét.*, vol. II, fasc. III, 1899, in CLAUTRIAU, *Nat. et significat. des alcaloïdes*, p. 98.

P. Anema. — De zetel der Alkaloiden bij enkele narkotische Planten. Utrecht, 1892, analysé in *Jahr. d. Pharm.*, 1892, p. 197-198.

Attfield. — On the food-value of the Kola-nut, a new source of theine. *Pharmaceutical Journal*, 2e sér., t. VI, p. 457-460, 1865.

A. Audemard. — Présence et localisation des alcaloïdes dans les organes floraux du *Spartium junceum*. *Bull. pharm. S. E.* Montpellier, t. VII, p. 40-42, 1902.

A. Audemard. — *Recherches sur la localisation des alcaloïdes dans les genêts (étude microchimique)*. Th. pharm. Montpellier, 1902, p. 68, in-8°.

Aweng. — Die Isolierung der wirksamen Bestandtheile von *Frangula*, etc... *Apot. Zeit.*, t. XVI, 1901, p. 257-259, 538-540.

Aweng. — Beiträge zur Kenntnis der wirksamen der Sennesblätter. *Apot. Zeit.*, t. XVI, 1901, p. 829.

Aweng. — Weitere Beiträge zur Kenntnis des wirksamen primären Glycosides der Frangularinde. *Apot. Zeit*, t. XVII, 1902, p. 372-373.

Barth. — Studien Uber den mikroch. Nachweis von Alkaloiden in Arzneidrogen. *Arch. d. Pharm.*, t. CCXXXVI, p. 354-367, 1898.

Berthemot et **Dechastelus.** — Chemische Untersuchung des Guarana. *Ann. der Chem. und Pharm.*, t. XXXVI, p. 90-93, 1840.

Berzelius. — *Jahresbericht*, t. XVII, p. 302, 1827, t. XVIII, p. 338, 1838.

R. Blondel. — Sur le parfum et son mode de production dans les roses. *Bull. Soc. bot.*, t. XXXVI, p. 107-113, 1889.

R. Blondel. — *Les Produits odorants des rosiers*, 163 pages in-4°, 1 pl., Paris, 1889.

Bœdecker. — Chemisch-physiologische Untersuchung einiger Stoffe aus der Familie der Menispermeen. *Annal. d. Chem. u. Pharm.*, t. LXIX, p. 374, 849.

Digitized by Google

Em. Bourquelot et **V. Harlay**. — Sur la recherche et la présence de la tyrosine dans quelques champignons. *Bull. Soc. myc. de France*, t. XII, p. 153-156, 1896. *Journ. pharm. chim.*, 6e sér., t. IV, p. 549-551, 1896.

H. Bouygues. — *Structure, origine et développement de certaines formes vasculaires anormales du pétiole de Dicotylédones*, p. 4-8, 103-105, Bordeaux, 1902.

Borscow. — Beiträge zur Histochemie der Pflanze. *Bot. Zeit.*, t. XXXII, pp. 17-25, 33-40, 1874.

L. Bræmer. — *Les Tannoides*. Toulouse, 150 p. in-4°, 1890.

L. Bræmer. — De la localisation des principes actifs des Cucurbitacées. Recherches histologiques et histochimiques. *C. R. Ac. Sc.*, t. CXVII, 753-754, 1893. — Toulouse, 58 p. in-8°, 7 pl., 1893.

Cador. — Anatomische untersuchung der Mateblätter. *Bot. Centralb.*, t. LXXXIV, p. 250, 1900.

Charbonnel-Salle. — *Recherches sur le rôle physiologique du tanin dans les végétaux*. Th. Sc. Paris, 1881, 31 p. in-8°.

Charpentier. — *Etude anatomique et microchimique des Quinquinas de culture*, 50 p. in-8°, Th. pharm., Paris, 1900, p. 40-41.

Chatin. — Etude sur la respiration des fruits. *C. R. Ac. Sc.*, t. LVIII, p. 576-579, 1864.

J. Chatin. — *Du siège des substances actives dans les plantes médicinales*, 173 p. in-8°, Paris, 1876.

G. Clautriau. — Recherches microchimiques sur la localisation des alcaloïdes dans le *Papaver somniferum*. *Ann. Soc. belge de microsc.*, t. XII, 1888, p. 67-85.

G. Clautriau. — L'azote dans les capsules de pavot. *Bull. de la Soc. belge de microscopie*, t. XVIII, p. 80-93, 1892.

G. Clautriau. — Localisation et signification des alcaloïdes dans quelques graines. *Ann. de la Soc. belge de microscopie*, t. XVIII, p. 35-54, 1894.

G. Clautriau. — Nature et signification des alcaloïdes végétaux. *Ann. de la Soc. royale des Sc. médic. et nat. de Bruxelles*, t. IX, fasc. II, p. 113, 1900.

Dragendorff. — *Die gericht. chem. Ermittelung von Giften* 3. Aufl. Göttingen, 1888, p. 197.

De Droog. — Contribution à l'étude de la localisation microchimique des alcaloides dans la famille des Orchidacées. *Mémoires couronnés et autres Mémoires publiés par l'Académie royale de Belgique*, t. LV, 1896-1897.

M. Elfstrand. — *Studier öfver Alkaloidernas lokalisation, företrädesvis inom familjen Loganiaceæ*. Upsala, 1895.

Errera. — Efficacité des structures défensives des plantes. *Bull. Soc. roy. bot. Belgique*, t. XXV, 1886.

Digitized by Google

Errera, Maistriau, Clautriau. — Premières recherches sur la localisation et la signification des alcaloïdes dans les plantes. Bruxelles, 1887. *Ann. Soc. belge de miscrosc.*, t. XII, 1885-1886.

Errera. — Sur la distinction microchimique des alcaloïdes et des matières protéiques. *Ann. Soc. belge de microsc.*, t. XIII, fasc. 2, p. 73-121, 1889.

Jos. Essmanoffsky. — Untersuchung der Saftgänge und der in innen vorkommenden eigenthümlichen Niederschläge bei Canna. Analysé, tiré de *Just Bot. Jahr.*, t. VII, I Abth, p. 10, 1879.

E. Fischer. — Synthesen in der Puringruppe. *Ber. d. d. Chem. Gesellsch.*, t. XXXII, t. I, p. 435-504, 1899. Trad. *Monit. Sc. Quesneville*, t. LIII-LIV, p. 465-476, 552-576, 1899.

Gardiner. — *Proceedings of the Cambridge physiological Society*, vol. IV, p. 393.

L. Gaucher. — *De la caféine et de l'acide cafétannique dans le caféier* (Recherches microchimiques). Th. pharm., Montpellier, 1895.

C. Gerber. — Rôle des tanins dans les plantes et plus particulièrement dans les fruits. *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXIV, p. 1106-1108, 1897.

Gerok et **Skipari.** — Uber den Sitz der Alkaloïde in Strychnossamen. *Arch. d. Pharm.*, t. CCXXX, p. 555-560, 1892.

Godfrin. — *Etude histologique sur les téguments séminaux des Angiospermes*, p. 91-92. Nancy, 1880.

Goris et **Reimers.** — Recherches microchimiques sur les Quinquinas. *Bull. Sc. pharm.*, t. III, p. 284-299, 1901.

L. Grès. — *Contribution à l'étude anatomique et microchimique des Rhamnées*, 95 p. in-8°, 2 pl. Th. pharm., Paris, 1901.

Gubler. — *Bull. Soc. bot.*, t. XI, p. 181-182, 1864 (Discussion entre Gubler et Chatin).

P. Guérin. — *Recherches sur la localisation de l'anagyrine et de la cytisine*, 62 p. in-8°, 6 pl. col. Th. pharm., Paris, 1895.

P. Guérin. — Développement de la graine et en particulier du tégument séminal de quelques Sapindacées. *Journ. bot.*, t. XV, p. 349, 1901.

L. Guignard. — Recherches sur la localisation des principes actifs des Crucifères. *Journ. bot.*, t. IV, p. 385-394, 412-430, 435-455, 1890.

L. Guignard. — Sur la localisation dans les amandes et le laurier-cerise des principes qui fournissent l'acide cyanhydrique. *Journ. pharm. et chim*, 5e série, t. XXI, p. 233-236, 289-303, 1890.

L. Guignard. — Recherches sur la nature et la localisation des principes actifs chez les Capparidées, Tropéolées, Limnanthées, Résédacées, Papayacées. *Jour. bot.*, t. VII, p. 345-364, 393-408, 417-426, 444-460, 1893.

L. Guignard. — Sur l'existence et la localisation de l'émulsine dans les plantes du genre Manihot. *Bull. Soc. bot.*, t. XLI, p. CIII-CVII, 1894.

Digitized by Google

L. Guignard. — Recherches sur certains principes encore inconnus chez les Papayacées. *Journ. bot.*, t. VIII, p. 67-79, 85-92, 1894.

Hanausek. — Zur histochemischen Caffeinreaction. *Zeitschr. d. Allg. Oest. Apoteker-Vereines*, p. 606-609, 1891.

Hartig. — Weitere Mittheilungen das Gerbmehl betreffend. *Bot. Zeit.*, t. XXIII, p. 53-57, 237-238, 1865.

Hartig. — *Gerbstoff d. Eiche*, 40 p. in-8°. C. f. *Anat. u. Physiol. d. Holzgewæchse*, p. 119, 1878.

Harz. — *Samenkunde*, p. 947-949, 1885.

Ed. Heckel. — Sur l'utilisation et les transformations de quelques alcaloïdes dans la graine pendant la germination. *C. R. Ac. Sc.*, t. CX, p. 88-90, 1890.

Heckel et **Schlagdenhaufen.** — Les kolas africains. *Ann. de l'Inst. col. de Marseille*, t. I, 1er mémoire, Paris, 1893.

O. Hermann. — *Nachweis organ. Verbindungen in vegetabil. Geweben.* Dissert. Leipsig, 1876.

Herzog. — Über salzsaures Thein. *Liebig's Annalen*, t. XXVI, p. 344-345, 1838.

Holfert. — Die Nährschicht der Samenschalen. *Flora*, p. 300, 1890.

Howard. — *The quinology of the East Indian plantations.* London, 1869, p. 7, pl. II.

G. Istwanffi. — Recherches sur la localisation de la substance active dans le piment. *Termeszétrajzi Füzetek*, t. XIV, p. 197-199, 1891, analysé dans *Zeits. f. Wiss. Mikrosp.*, t. IX, p. 271, 1892.

F. Jadin. — *Du siège des principes médicamenteux dans les végétaux*, 154 p. in-4°. Montpellier, 1894.

Jobst. — Thein identisch mit Caffein. *Liebig's Annalen*, t. XXV, p. 63-66, 1838.

Kayser. — Beit. z. Kenntniss der Entwickelungsgeschichte der Samen. *Pringsheim's Jahrb. für Wiss. Bot.*, t. XXV, p. 117-125, 1893.

Kielmeyer et **Kœstlin.** — *De materiis narcoticis regni vegetalis earumque ratione botanica.* Tubingen, 1808.

Klebs. — Einige Bemerkungen zu der Arbeit von Krasser. « Untersuch. über das Vorkommen von Eiweiss in der pflanzlichen Zellhaut ». *Bot. Zeit.*, t. XLV, p. 697-768, 1887.

Knop u. **Wolf.** — Notiz über die stickstoffhaltigen Nahrungsmittel der Pflanzen. *Die landwirtsch. Versuchsst.*, t. VII, p. 308, 1865.

F. Krasser. — Untersuch. Über das Vorkommen von Eiweiss in der pflanz. Zellhaut nebst. Bemerkungen über den mikroch. Nachweis der Eiweisskörper. *Sitzung. d. k. Akad. d. Wiss. zu Wien.*, t. XCIV, p. 118, 1886.

G. Kraus. — *Grundlinien zu einer Physiologie des Gerbstoffs.* Leipsig, 1889, in-8°.

Digitized by Google

E. Laves. — Ueber die Zusammensetzung der Früchte von *Æsculus Hippocastanum. Pharmaceut. centralblatt.*, t. XLII, p. 333-336, 1901.

Lecomte. — Sur la formation du parfum de la vanille. *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXIII, p. 745-748, 1901.

Lindt. — Uber d. mikrochem Nachweis von Brucin u. Strychnin. *Zeitschr. f. Wiss. Mikrosk.*, t. I, p. 237-240, 1884.

Lotsy. — De localisatie van het alcaloid in *Cinchona Calisaya Ledgeriana* en in *C. succirubra. Mededeelingen van de Laboratoria der Gouvernement's kinaonderneming.* Batavia, 1898, 128 p. avec 36 figures et 20 planches coloriées.

L. Lutz. — Localisation des principes actifs dans les Séneçons. *Bull. Soc. bot.*, t. XLII, p. 486-488, 1895.

L. Lutz. — Sur la présence et la localisation dans les graines d'un certain nombre de Pomacées des principes fournissant l'acide cyanhydrique. *Union Pharm.*, t. XXXVIII, p. 193-198, 1897.

L. Lutz. — Sur la présence et la localisation dans les graines de l'*Eriobotrya Japonica* des principes fournissant l'acide cyanhydrique. *Bull. Soc. Bot.*, t. XLIV, 263-265, 1897.

Fr. Macqret. — *Etude sur l'Aloès.* Th. Pharm., Paris, 1888.

Marcacci. — L'azione degli alcaloidi nel regno vegetale et animale. *Annali di chimica farmacologica*, Milano, 1887, in **Clautriau.** *Nat. et significat. des alcaloïdes*, p. 103.

Marcet. — De l'action des poisons sur le règne végétal. *Ann. de chim. et phys.*, t. XXIX, p. 200-225, 1825.

Martius. — Uber die Zusammensetzung des Guaranin. *Ann. der Chem. und Pharm.*, t. XXXVI, p. 93-94, 1840.

E. Mesnard. — Recherches sur les modes de production des parfums dans les fleurs. *C. R. Ac. Sc.*, t. CXV, p. 892-895, 1892.

E. Mesnard. — Recherches sur la formation des huiles grasses et des huiles essentielles dans les végétaux. *Ann. Sc. nat.*, 7e sér., t. XVIII, 257-398, 1893.

Ph. Molle. — Recherches de microchimie comparée sur la localisation des alcaloïdes dans les Solanacées, 60 p. in-8°, 1 pl. Extrait du t. LIII des *Mémoires couronnés et autres Mémoires publiés par l'Acad. royale de Belgique*, 1895.

Molisch. — *Grundriss einer Histochemie der pflanzlichen Genussmittel*, 65 p. in-8°. Iéna, 1891.

Mulder. — Chemische Untersuchung des chinesischen und javanischen Thees. *Poggend. Ann.*, t. XLIII, p. 161-183, 1838.

Nicholson. — Uber Caffein und einige seiner Verbindungen. *Ann. der Chem. u. Pharm.*, t. LXII, p. 71-82, 1847.

Œrsted. — Zur beleuchtung der Blumen des brasilianischen Theestrauches (*Neea theifera*). *Bot. Zeit.*, t. XXII, p. 216-224, 1869.

R. Otto. — Welchen Einfluss haben strychninlosungen auf die

Digitized by Google

Entwickelung von Pflanzen. *Naturw. Wochensch.*, t. IX, p. 625, 1894.

Oudry. — Thein eine organische Salzbase im Thee. *Magasin für Pharmacie*, t. XIX, p. 49-50, 1827.

Payen. — Sur la caféine. *Ann. de chim. et phys.*, 3e sér., t. XXVI, p. 108, 1849.

Petit et **Terrat**. — Sur le dosage de la caféine dans le thé. *Bull. Soc. chim.*, 3e sér., t. XV, p. 811-815, 1896.

W. Pfeffer. — Hesperidin, ein Bestandtheil einiger Hesperideen. *Bot. Zeit.*, t. XXXII, p. 529-539, 1874.

Pfeffer. — Pflanzenphysiologie, II. Auflage, p. 399 et 499, 1897.

Piria. — *Ann. de chim. et phys.*, t. LXIX, 2e sér., p. 281-326, 1838 et 3e sér., t. XIV, p. 256-301, 1845.

Poulsen. — *Microchimie végétale*. Edition française. Paris, 1883.

Raciborski. — Ein Inhaltskörper des Leptoms. *Ber. d. d. Bot. Gesellsch.*, XVI, p. 52-63, 1898, et Weitere Mittheilungen über das Leptomin. *Ibid.*, XVI, p. 119-123, 1898. Analysé in *Journ. pharm. chim.*, 6e sér., t. IX, 387-390, 1899.

Reisch und **C. Mikosch**. — Uber Eiweiss reaktionen und deren mikroch. Anwendung. *Jahrb. d. k. k. oberrealschule I, Bezirke von Wien*, 1890.

Réveil. — *Recherches de physiologie végétale. Action des poissons sur les plantes*. Lyon, 1865.

Rocheleder. — Uber das Caffein. *Ann. d. Chem. u. Pharm.*, LXIX, p. 120-125, t. LXXI, p. 1-12, 1849.

Rosoll. — Beitrage z. istochemie d. Pflanze. *Sitzgsb. Ak. wiss. Wien.*, t. LXXXIX, p. 137-150, 1884, et *Monatshefte für Chemie*, 1884, p. 94-107.

A Rosoll. — *Uber den mikroch. Nachweis der Glycoside und Alkaloid in den vegel. Geweben* (25 Jahresb. des Landes-Realgymnasiums zu Stockerau). Stockerau, 1889-1890.

Runge. — *Schweigger's Journal für Chemie und Physik*, t. XXXI, p. 308, 1820, et *Mater. z. Phytologie*, t. I, p. 146, 1821.

Sachs. — Mikrosk. Untersuch. et Physiolog., Untersuch. üb. Keimung d. Schmingbohne. *Sitzb. Ak. Wiss. Wien.*, XXXVI, p. 23, XXXVII, p. 57.

Sachs. — *Vorlesungen uber Pflanzenphysiologie*, p. 396, 1882.

L. Sauvan. — Recherches sur la localisation des principes actifs dans *l'Helleborus fœtidus. Répertoire de Pharm.*, 3e sér., t. VII, p. 529-530, 1895.

L. Sauvan. — Recherches sur la localisation de la brucine et de la strychnine dans les semences de *S. Nux vomica*, *S. Ignatii*, *S. Gautheriana. Journ. Pharm. Chim.*, 6 sér., t. I, p. 496-498, 1895.

L. Sauvan. — Localisation des principes actifs dans les végétaux. *Journ. bot.*, t. X, p. 126-132, 133-140, 157-162, 1896.

Digitized by Google

L. Sauvan. — Recherches sur la localisation de la daphnine dans les *Daphne Alpina et D. Gnidium. Journ. pharm. chim.*, 6e sér., t. III, p. 443-445, 1896.

Schaarschmidt. — Uber d. mikrochem. Reaction des Solanin. *Zeitschr. f. Wis. Mikroskopie*, t. I, p. 61-62, 1884.

Shell. — Physiol. Untersuch. d. Gerbsaure. *C. f. Pflanzenphysiologie*, t. I, p. 305.

Schulber. — Untersuch. über die Einwirkung verschiedener Stoffe des organischen und unorganischen Reiches auf das Leben der Pflanzen. *Flora*, t. II, p, 753, 1827.

Schmidt. — Uber das Vorkommen von Cafein im Cacao. *Liebig's Annalen*, t. CCXVII, p. 303-308, 1883.

Shimper. — Anleitung z. mikroskopischen Untersuchung d. Nahrungs. u. Genussmittel. Iéna, 1886.

W. Spatzier. — Uber das Auftreten und die physiologische Bedeutung des Myrosins in der Pflanze. *Pringhs Jahr.*, t. XXV, p. 39-78, 1893.

Stenhouse. — Nachträgliches uber das Thein. *Ann. der Chem. und Pharm.*, t. XLVI, p. 227-230, 1843.

Strecker. — Etude sur les transformations de la théobromine, de la caféine, des acides parabanique, taurocholique, glycocholique et lactique. *C. R. Ac. Sc.*, t. LII, p. 1268-1271, 1861.

De Toni et **Mach.** — Sopra l'influenza esercitata dalla nicotina e dalla solanina sulla germogliazione dei semi di tabacco. *Boll. d. r. Instituto bot. d. Universita Parmense*, p. 63, 1893. Parma, in Clautriau, *Nat. et significat. des alcaloïdes*, p. 103.

A. Trécul. — Du suc propre dans les feuilles d'Aloès. *C. R. Ac. Sc.*, t. LXXII, p. 520-531, 1871. *Ann. Sc. nat.*, 5 sér., t. XIV, p. 80-90, 1871.

M. Treub. — Sur la localisation, le transport et le rôle de l'acide cyanhydrique dans le *Pangium edule* Reinw. *Ann. du Jard. bot. de Buitenzorg*, t. XIII, p. 1-85, 11 pl. col., 1896.

Trimble. — *The Tannins*, 2 vol. in-12°, Philadelphia, 1892.

Vanderlinden. — Recherches microchimiques sur la présence des alcaloïdes et des glycosides dans la famille des Renonculacées. *Ann. Soc. royale des Sc. méd. et nat. de Bruxelles*, t. X, fasc. I, 1901, 50 p. in-8°, 2 pl. color.

Villeneuve. — Etude sur le Redoul (*Coriaria myrtifolia*), p. 30-32, 62 p. in-4°, Montpellier, 1893.

De Varigny. — L'atropine est-elle un engrais végétal? *Revue générale de botanique*, t. IV, p. 407-420, 1892.

Warming. — Beobacht. üb. Pflanz. mit überwinter. Laubblätter. *Botan. Centralbl.*, t. XVI, p. 350-351, 1883.

A. de Wèvre. — Localisation de l'atropine. *Bull. Soc. belge de microsc.*, t. XIV, p. 19, 1889.

Digitized by Google

A. de Wèvre. — Sur l'alcaloïde des Narcisses. *Bull. Soc. belge de microsc.*, t. XIII, p. 137-140, 1889.

A. de Wèvre. — Recherches sur la technique microchimique des albuminoïdes. *Bull. Soc. belge de microsc.*, t. XX, p. 91-120, 1894.

Wigand. — Sitz. d. China-Alkaloïde et Sätze üb. physiol. Bedeut. d. Gerbstoffs. *Bot. Zeit.*, t. XX, p. 241.

E. de Wildeman. — Présence et localisation d'un alcaloïde dans quelques Orchidées. *Bull. de la Soc. belge de microsc.*, t. XVIII, p. 101-112, 1892.

E. Wothtschall. — Uber die mikroch. Reactionen des Solanins. *Zeitschr. für Wiss. Mikroskopie*, t. V, p. 19-38, 182-195.

E. Wothtschall. — Zur Frage uber die Verbreitung und Vertheilung des Solanins in den Pflanzen. *Arbeit. d. Nat. Ver. zu Kasan*, t. XVIII, p. 103, 74 p., 1889. Analysé in *Bot. Centralbl.*, t. XLI, p. 100-103, 1890.

E. Zacharias. — Uber Eiweiss, Nuklein und Plastin. *Bot. Zeit.*, t. XLI, p. 209-215, 1883.

Digitized by Google

TABLE DES MATIERES

NTRODUCTION. 7

PREMIÈRE PARTIE

Des méthodes de localisation des principes actifs chez les végétaux 11

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES SUR L'ÆSCULUS HIPPOCASTANUM ET LE PAVIA RUBRA

CHAPITRE I. — De l'esculine. Propriétés et réactions qui permettent sa localisation. 23
CHAPITRE II. — Localisation spéciale de l'esculine dans les tissus des organes de l'*Æsculus* 37
CHAPITRE III. — Répartition des cellules à esculine dans les tissus des différents organes de l'*Æsculus Hippocastanum* développées dans des conditions spéciales 55
CHAPITRE IV. — Acide esculitannique. Sa répartition dans le végétal. Ses rapports avec l'esculine 69
CHAPITRE V. — Localisation de l'esculine dans le *Pavia* . . . 84

TROISIÈME PARTIE

RECHERCHES CONCERNANT D'AUTRES GLUCOSIDES

CHAPITRE I. — Localisation de la fustine dans le *Rhus cotinus* . 86
CHAPITRE II. — — de la fraxine dans le *Fraxinus excelsior* 91

Digitized by Google

CHAPITRE III. — Localisation de la daphnine dans le *Daphne alpina*. 99
CHAPITRE IV. — Localisation de la salicine dans le *Salix alba*. 103
CHAPITRE V. — Essais de localisation de la caféine. 112

QUATRIÈME PARTIE

CONCLUSIONS 123
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE 131

TABLE DES PLANCHES ET FIGURES

Planche I 39
— II 53
— III 59
— IV 65
— VI à Pl. XIII, pl. en couleurs, à la fin du volume.
Figure I. — Schéma de la structure anatomique du pétiole et de la nervure médiane de l'*Æsculus* . . . 42
— II. — Localisation de l'esculine dans une racine d'*Æsculus*. 45
— III. — Schéma montrant la disposition des pièces dans le bouton floral de l'*Æsculus*. 47
— IV. — Coupe transversale de l'anthère 50
— V. — Structure anatomique de l'extrémité de la radicule (germination) 62
— VI. — Localisation de l'esculine dans la pétiole cotylédonaire de l'*Æsculus*. 63
— VII. — Localisation de la Fustine dans la feuille de *Rhus* 90
— VIII.— Localisation de la fraxine dans l'écorce du *Fraxinus* 97
— IX. — Localisation de la salicine dans la feuille de *Salix Alba* 109

Digitized by Google

2e THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

ZOOLOGIE. — Les Hirudinées : Organisation, Biologie, Affinités Zoologiques.

GÉOLOGIE. — Les Formations Gypseuses du Bassin de Paris.

Digitized by Google

Digitized by Google

LÉGENDES DES PLANCHES EN COULEURS

Planche V

Fig. 1. — Localisation de l'esculine dans la tige d'*Æsculus Hippocastanum*. *ép.*, épiderme. — *p. c.*, parenchyme cortical. — *end.*, endoderme. — *pér.*, péricycle. — *l.*, liber. — *b.*, bois. — *m.*, moelle.

Fig. 2. — Coupe du pétiole d'*Æsculus* montrant la localisation de l'esculine dans la région épidermique. — *ép.*, épiderme. — *p. c.*, parenchyme cortical.

Fig. 3. — Coupe du pétiole d'*Æsculus* montrant la localisation de l'esculine dans l'endoderme. — *p. c.*, parenchyme cortical. — *end.*, endoderme. — *pér.*, péricycle.

Planche VI

Fig. 1. — Localisation de l'esculine dans l'endoderme, et la région périmédullaire d'un faisceau d'*Æsculus Hippocastanum*. — *end.*, endoderme. — *pér.*, péricycle. — *t. c.*, tubes criblés. — *p. l.*, parenchyme libérien. — *b.*, bois. — *m.*, moelle.

Fig. 2. — Localisation de l'esculine dans le liber de l'*Æsculus Hippocastanum*. — *l.*, liber. — *pér.*, péricycle.

Planche VII

Répartition de l'esculine dans une écorce âgée de l'*Æsculus*. — *as. s. ph.*, assise subéro-phellodermique. Le rhytidome emporte la plus grande partie de l'esculine.

Planche VIII

Fig. 1. — Localisation de l'esculine dans une jeune racine d'*Æsculus Hippocastanum* L. — *p. r.*, poils radicaux. — *as. p.*, assisse pilifère. — *p. c.*, parenchyme cortical. — *end.*, endoderme. — *pér.*, péricycle. — *l.*, liber. — *b.*, bois.

Fig. 2. — Structure d'un faisceau médullaire du pétiole d'*Æsculus Hippocastanum* montrant la localisation de l'esculine. — *l.*, liber.

Digitized by Google

Planche IX

Fig. 1. — Localisation de l'esculine dans l'étamine de l'*Æsculus*.
Fig. 2. — — — dans le sépale de l'*Æsculus*.
Fig. 3. — — — dans le pétale de l'*Æsculus*.

Planche X

Fig. 1. — Coupe d'une jeune feuille d'*Æsculus Hippocastanum* (germination) montrant la localisation de l'esculine dans l'épiderme, l'assise sous-épidermique, l'endoderme et la région péridermique.
Fig. 2. — Localisation de l'esculine dans une écaille du bourgeon du marronnier. — *ép.*, épiderme. — *end.*, endoderme. — *l.*, liber. — *b.*, bois.
Fig. 3. — Faisceau cotylédonaire situé près de la radicule (germination). (*L'esculine se trouve exclusivement localisée dans l'endoderme*).
Fig. 4. — Structure anatomique de la feuille d'*Æsculus Hippocastanum* montrant la localisation de l'esculine. — *ép. s.*, épiderme supérieur. — *p. p.*, parenchyme palissadique. — *p. l.*, parenchyme lacuneux. — *ép. i.*, épiderme inférieur.

Planche XI

Fig. 1. — Localisation de l'esculine dans une radicule (germination de l'*Æsculus Hippocastanum*).
Fig. 2. — Localisation de l'esculine dans l'écorce de la racine. — *s.*, suber. — *p. c.*, parenchyme cortical. — *l.*, liège. — *r. m.*, rayons médullaires. — *b.*, bois.

Planche XII

Fig. 1. — Localisation de la fustine dans l'endoderme et le liber du pétiole du *Rhus cotinus*.
Fig. 2. — Localisation de la fustine dans un jeune rameau de *Rhus*. — *ép.*, épiderme. — *a. s. p.*, assise subéro-phellodermique. — *p. c.*, parenchyme cortical. — *pér.*, péricycle. — *c. s.*, canal sécréteur. — *l.*, liber. — *b.*, bois. — *m.*, moelle.
Fig. 3. — Cellules à tanin du parenchyme de la nervure médiane de la feuille de *Thea sinensis*.

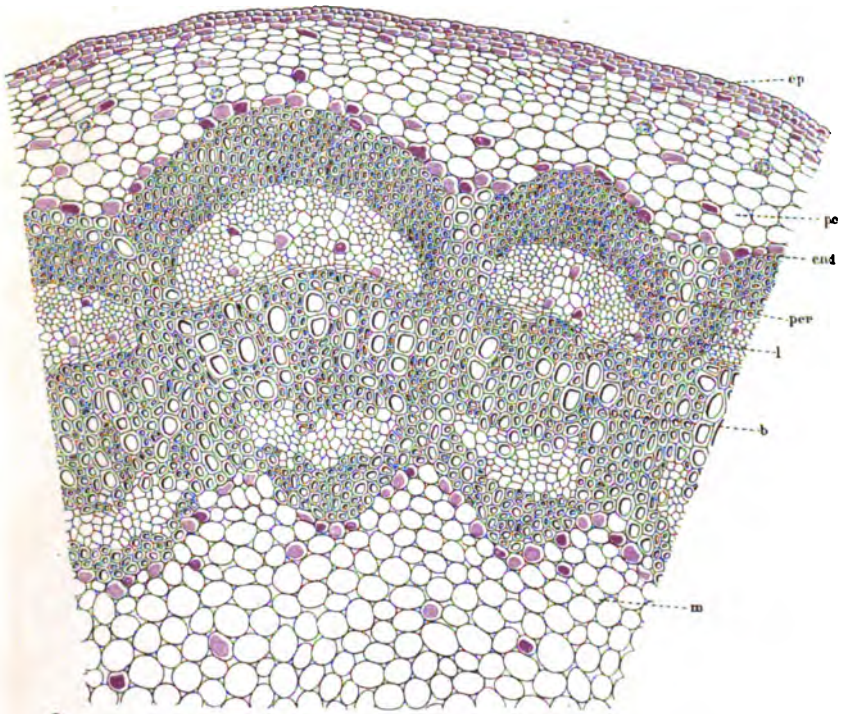
Planche XIII

Localisation de la salicine dans la tige et l'écorce du Salix alba.
Fig. 1. — Tige de *Salix alba*. — *ép.*, épiderme. — *col.*, collenchyme. — *f. pér.*, fibres péricycliques. — *l.*, liber. — *r. m.*, rayons médullaires. — *b.*, bois.
Fig. 2. — Ecorce âgée de *Salix alba*. — *f. l.*, fibres libériennes. — *r. m.*, rayons médullaires.

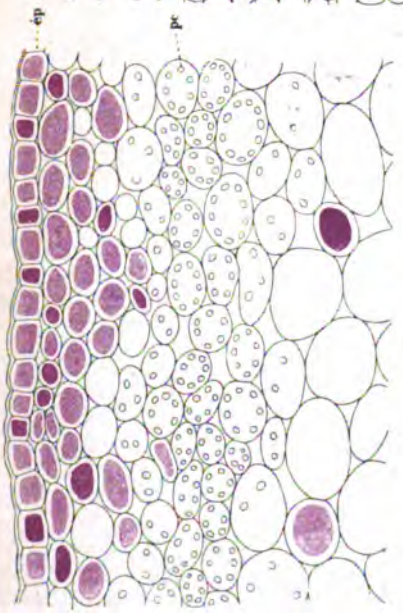
17-3-03. — Tours, imp. E. Arrault et Cie.

Digitized by Google

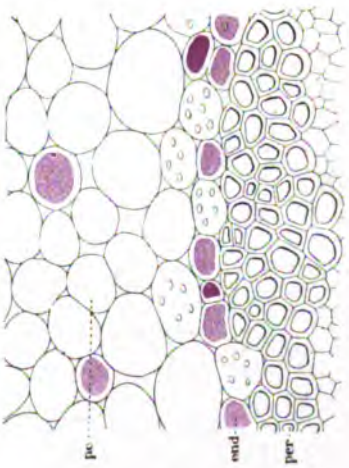
1



2



3



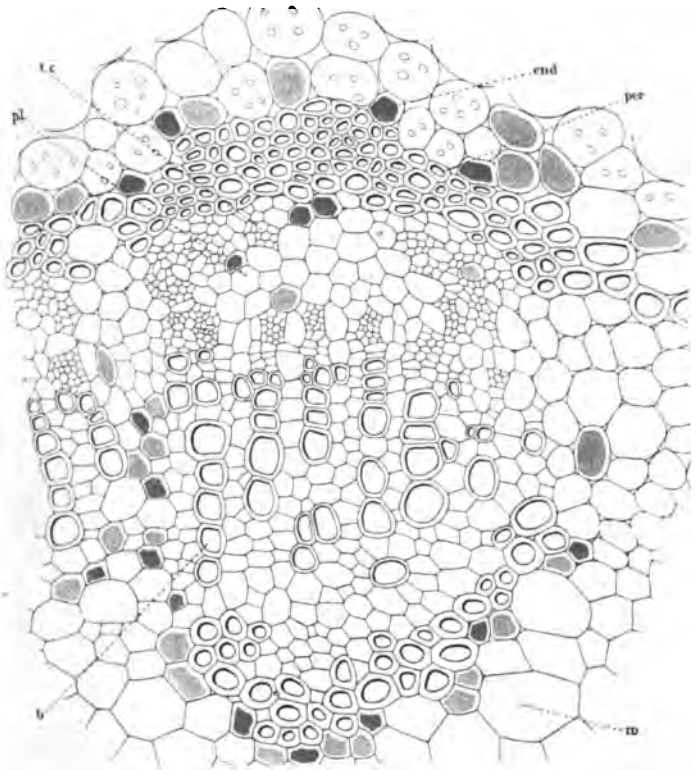
Pl. V.

A. Goris, del. Bonard, sc.

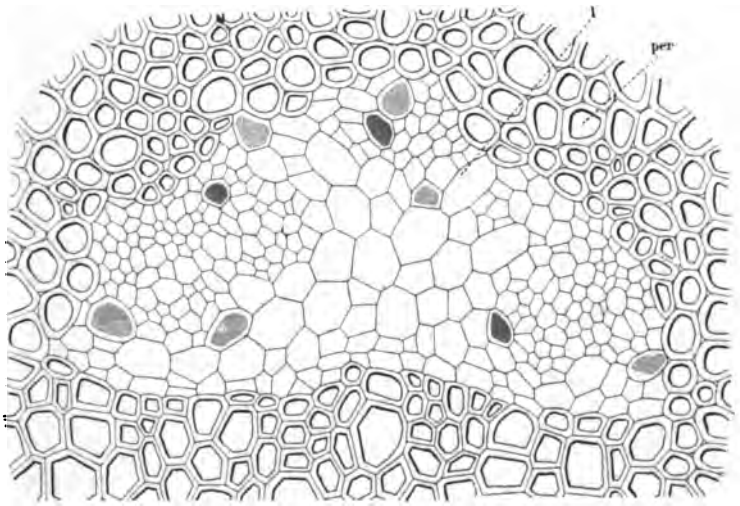
Digitized by Google

Digitized by Google

1



2

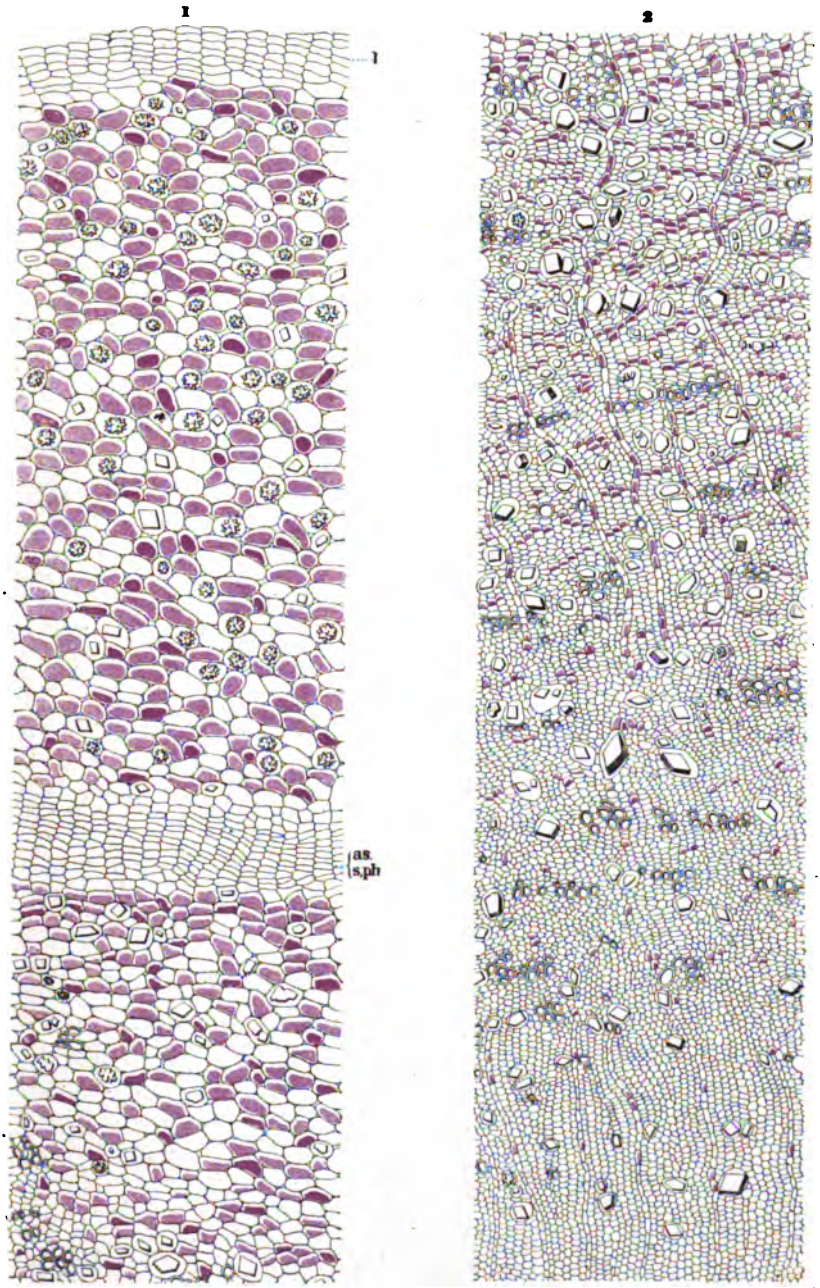


Pl. VI.

A. Goris, del. Bonard, sc.

Digitized by Google

Digitized by Google



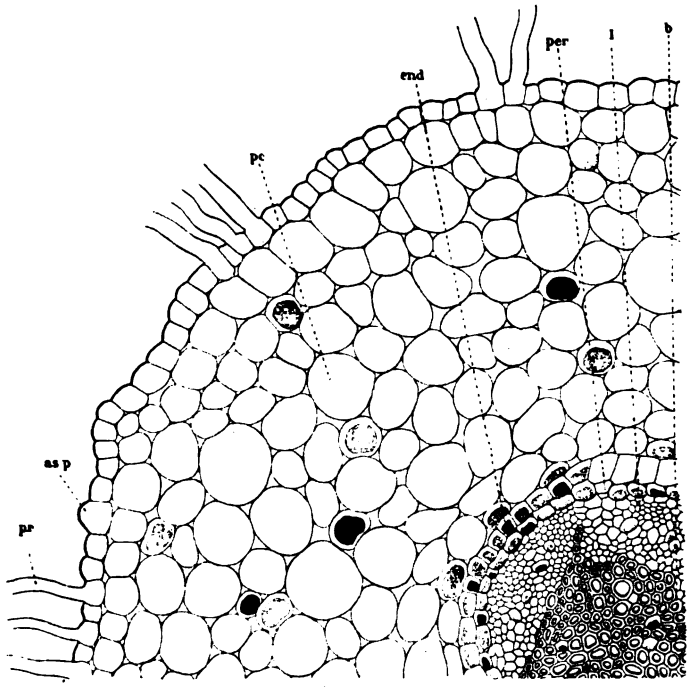
Pl. VII.

A. Duval, del. Bonard, sc.

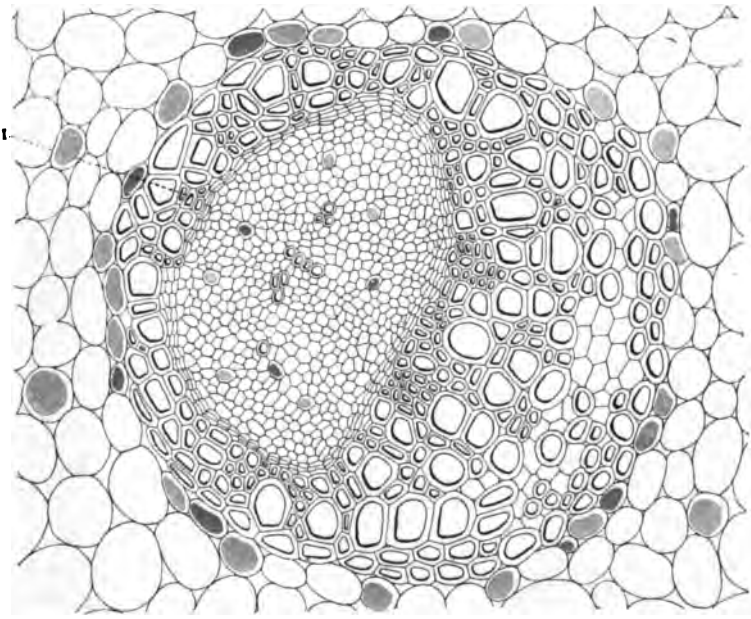
Digitized by Google

Digitized by Google

1



2

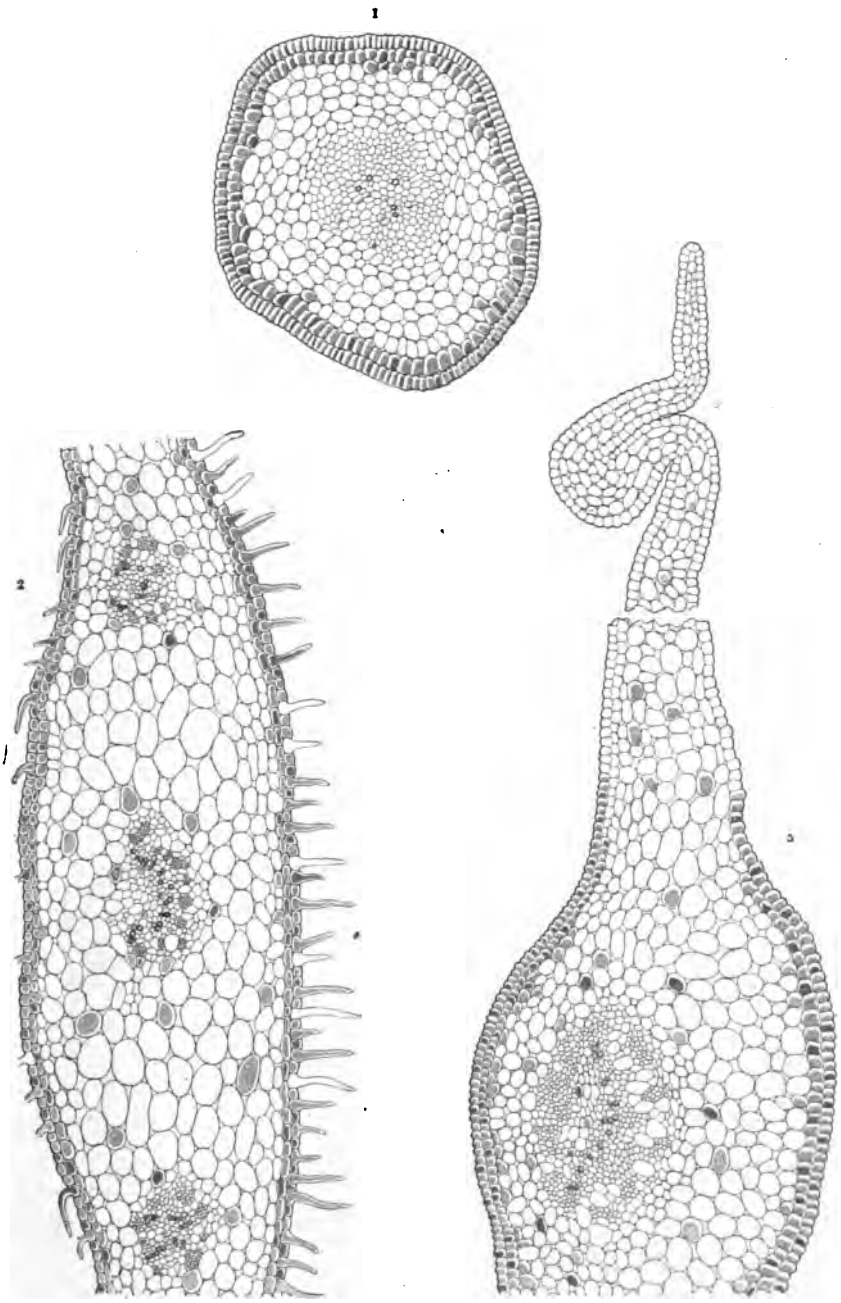


Pl. VIII.

A. Goris, del. Bonard, sc.

Digitized by Google

Digitized by Google

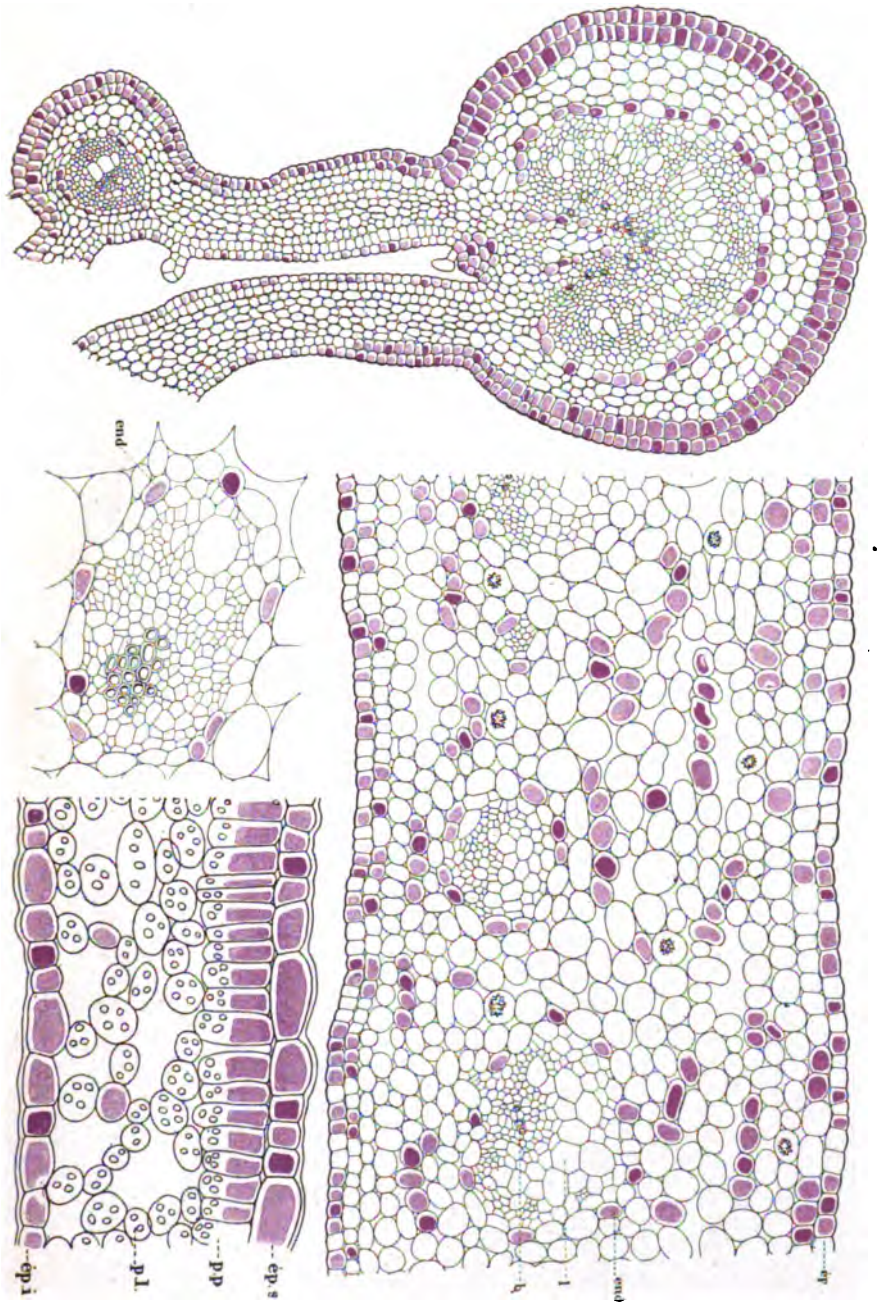


Pl. IX.

A. Goris, del. Bonard, sc.

Digitized by Google

Digitized by Google

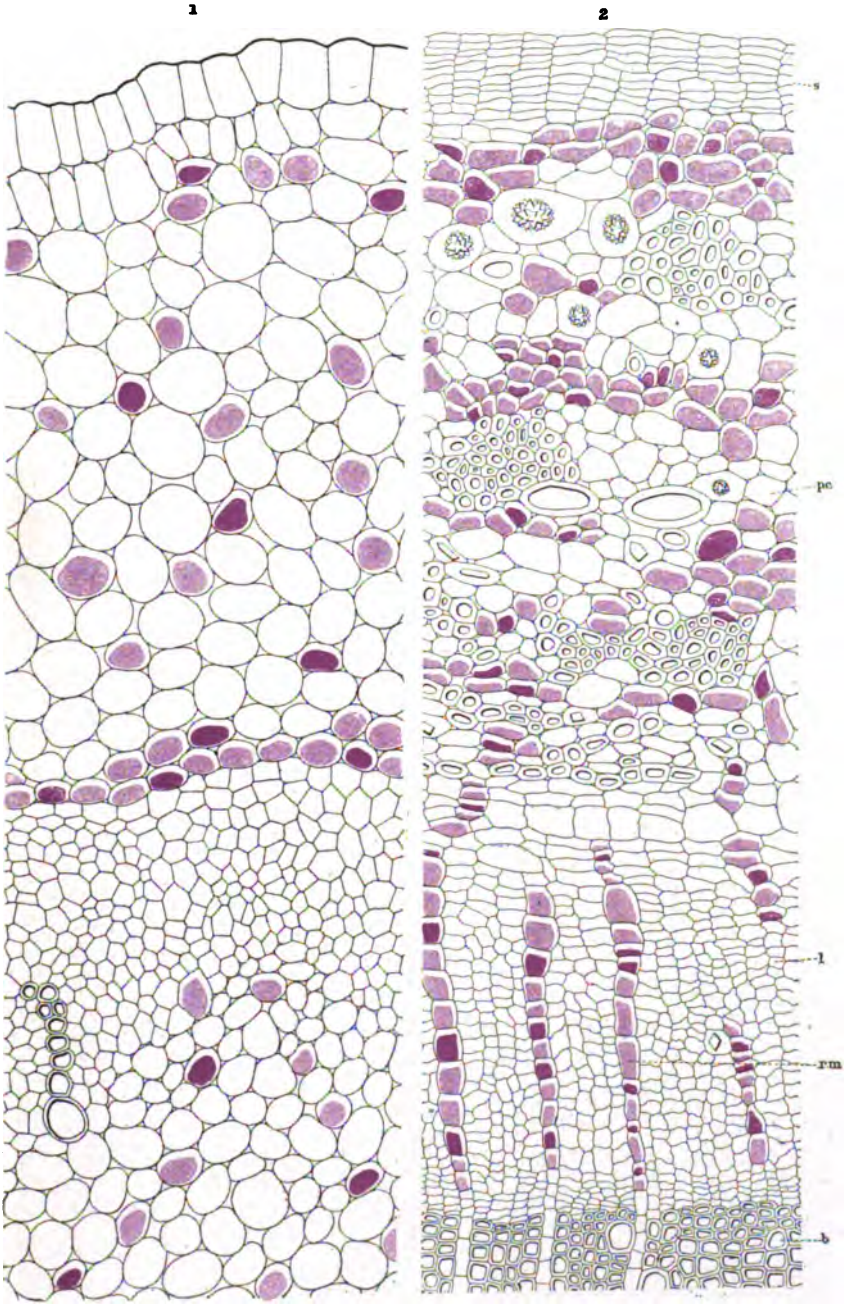


Pl. X.

A. Goris, del. Bonard, sc.

Digitized by Google

Digitized by Google

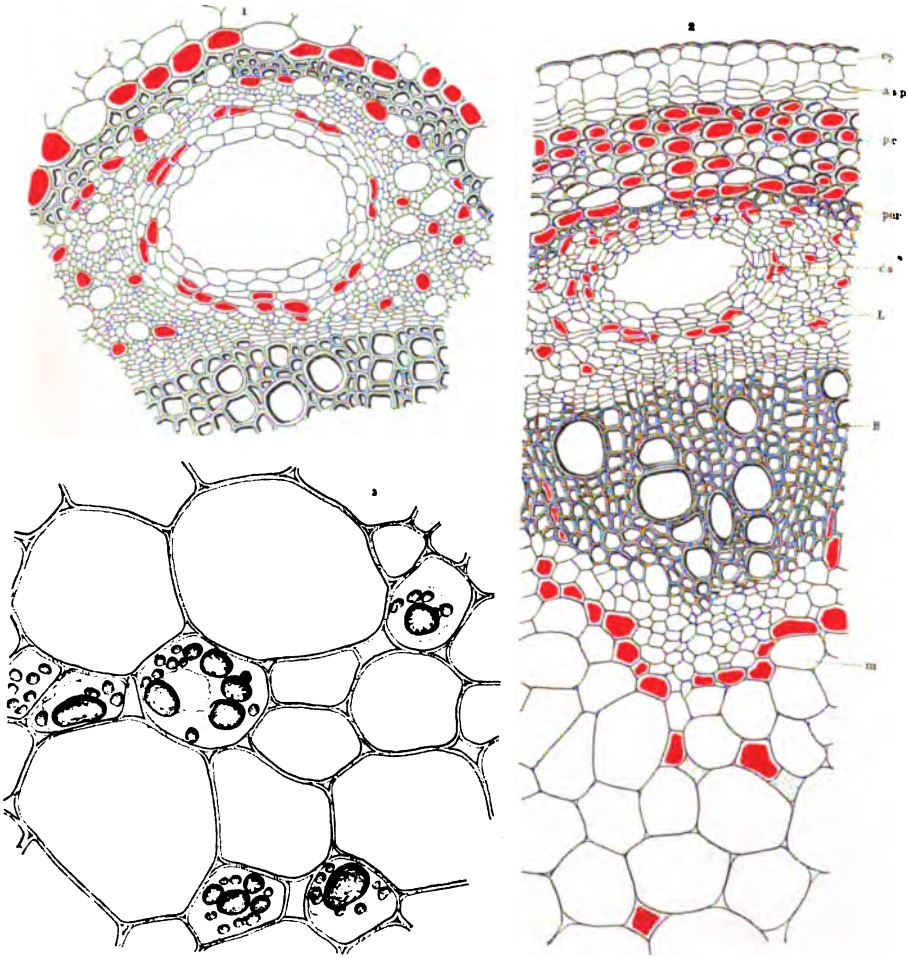


Pl. XI.

A. Goris, del. Bonard, sc.

Digitized by Google

Digitized by Google

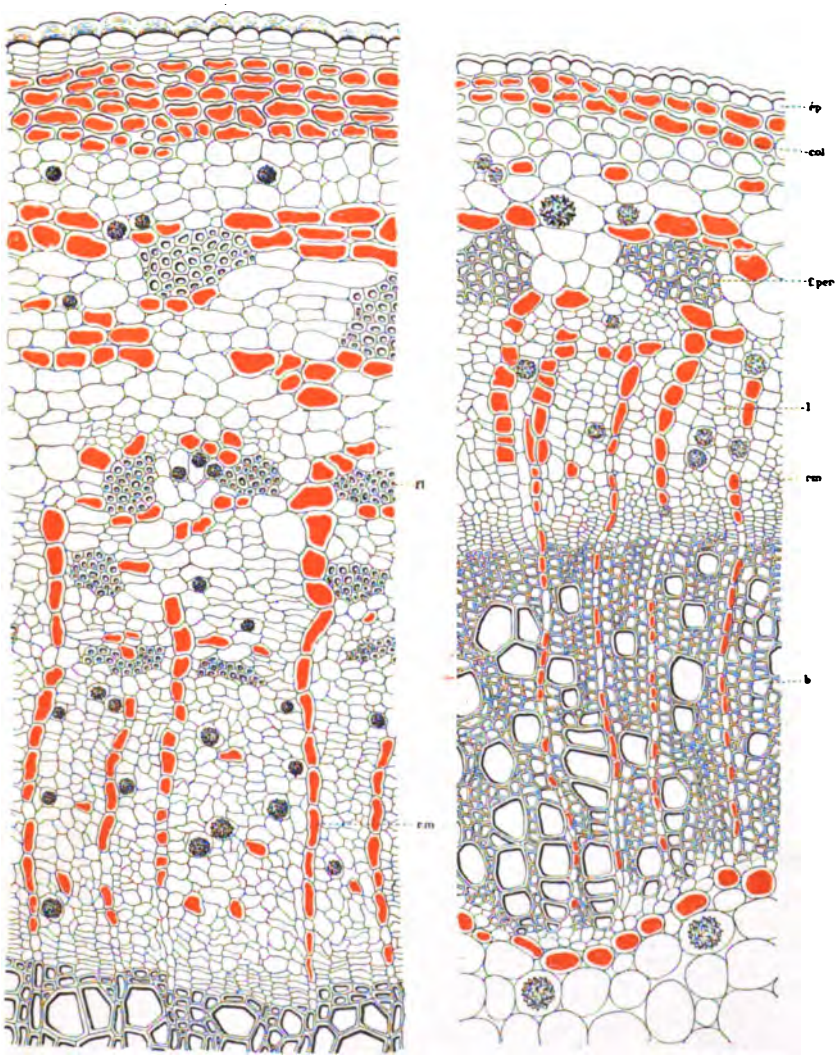


Pl. XII.

A. Goris, del. A. Duval, sc.

Digitized by Google

Digitized by Google



2 1

Pl. XIII.

A. Goris, del. A. Duval, sc.

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google